

UNIVERSITE DU QUEBEC

MEMOIRE

PRESENTE A

L'UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAITRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR

PIERRE NADEAU

ETUDE DE L'INTERACTION

DES ANTIBIOTIQUES POLYENIQUES

AVEC LE CHOLESTEROL ET L'ERGOSTEROL

AOUT 1981

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au département de chimie-biologie de l'université du Québec à Trois-Rivières, sous la direction du Dr Ilona Gruda, à qui j'adresse mes remerciements pour le support qu'elle m'a apporté tout au long de ce travail.

Je veux également adresser mes remerciements au Dr Gerald Medoff et au Dr Janina Brajtburg, pour m'avoir si chaleureusement accueilli durant huit semaines, à l'intérieur de leurs laboratoires du centre de recherches de l'école de médecine de "Washington University", à St-Louis au Missouri.

Je remercie spécialement Maryse, ma femme, pour avoir dessiné la majorité des dessins présentés dans le présent mémoire, et surtout pour l'appui qu'elle m'a constamment témoigné au cours de ce travail.

Je remercie également le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie (CRSNG) pour son assistance financière, ainsi que le gouvernement du Québec pour avoir défrayer les coûts de transport lors de mon stage à St-Louis.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	11
TABLE DES MATIERES	111
LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES TABLEAUX	viii
I- INTRODUCTION	1
II- ORIGINE ET PROPRIETES DES ANTIBIOTIQUES POLYENIQUES	6
1. Structure générale et propriétés	6
2. Chimie et classification des polyènes	8
3. Solubilité des antibiotiques polyéniques	11
4. Stabilité des antibiotiques polyéniques	12
III- MECANISME D'ACTION DES ANTIBIOTIQUES POLYENIQUES .	15
1. Interaction avec les stérols	15
2. Rôle des stérols dans les membranes eukariotes	18
3. Formation de pores	20
a) Complexe amphotéricine B - cholestérol	21
b) Complexe nystatine - cholestérol	22
c) Complexe filipine - cholestérol	24
4. Pertinence des modèles proposés	25
5. Objectifs du présent travail	28
IV- PARTIE EXPERIMENTALE	33
1. Produits	33
2. Essais spectroscopiques	34
a) Spectres différentiels	36
3. Détermination des coefficients d'extinction molaire	38
a) Antibiotiques polyéniques	38
b) Complexes antibiotique - stérol	42

4.	Essais biologiques	43
	a) Protection des cellules Candida albicans	46
	b) Protection des érythrocytes	47
	c) Préparation des liposomes de lécithine	
	d'oeuf	49
V-	RESULTATS ET DISCUSSION	51
	1. Spectre d'agrégats	51
	2. Calcul de la concentration des complexes . . .	55
	3. Filipine	58
	4. Nystatine	63
	5. Amphotéricine B	68
	a) Résultats biologiques	68
	b) Résultats spectroscopiques	80
	6. Etruscomycine	91
	a) Résultats biologiques	91
	b) Résultats spectroscopiques	95
VI-	CONSLUSION	110
VII-	LISTE DES OUVRAGES CITES	113

LISTE DES FIGURES

1-	Modèle de demi-pore proposé par De Kruijff et Demel pour l'amphotéricine B et le cholestérol	p. 23
2-	Représentation schématique du complexe filipine cholestérol (modèle de De Kruijff et Demel)	p. 23
3-	Modèle de demi-pore proposé par Marty et Finkelstein	p. 27
4-	Structure chimique de la filipine, de l'étruscomycine, de la nystatine et de l'amphotéricine B	p. 31
5-	Schéma représentant la disposition des différentes solutions dans le spectrophotomètre, lors de mesures spectroscopiques différentielles	p. 37
6-	Détermination du coefficient d'extinction molaire de l'amphotéricine B	p. 40
7-	Détermination du coefficient d'extinction molaire de l'étruscomycine	p. 41
8-	Spectre d'agrégat de l'amphotéricine B obtenu par ordinateur	p. 53
9-	Spectre de l'amphotéricine B libre dans le propanol	p. 54
10-	Spectres d'absorption différentielle de la filipine en présence des stérols dans le méthanol	p. 59
11-	Spectres d'absorption différentielle de la filipine en présence des stérols dans le propanol	p. 60
12-	Spectres d'absorption différentielle de la nystatine en présence des stérols dans le méthanol	p. 64
13-	Spectres d'absorption différentielle de la nystatine en présence des stérols dans le propanol	p. 65
14-	Courbes de la protection biologique des érythrocytes humains par le cholestérol et par des liposomes de lécithine d'oeuf contenant 34% et 63% en mole de cholestérol, contre l'action de l'amphotéricine B. Les courbes sont exprimées en fonction du rapport molaire amphotéricine B/cholestérol	p. 70

- 15- Courbes de la protection biologique des érythrocytes humains par trois types de liposomes contenant 0%, 34% et 63% en mole de cholestérol, contre l'action de l'amphotéricine B. Les courbes sont exprimées en fonction du rapport molaire amphotéricine B/phospholipides. p. 71
- 16- Courbe de la protection des fungus *Candida albicans* par deux types de liposomes contenant 34% et 63% en mole de cholestérol, contre l'action de l'amphotéricine B. Les courbes sont exprimées en fonction du rapport molaire amphotéricine B/cholestérol. p. 75
- 17- Courbe de la protection des fungus *Candida albicans* par trois types de liposomes contenant 0%, 34% et 63% en mole de cholestérol, contre l'action de l'amphotéricine B. Les courbes sont exprimées en fonction du rapport molaire amphotéricine B/phospholipides. . . p. 76
- 18- Spectres d'absorption différentielle de l'amphotéricine B en présence des stérols dans le méthanol . p. 81
- 19- Spectres d'absorption différentielle de l'amphotéricine B en présence des stérols dans le propanol . p. 82
- 20- Spectre d'absorption différentielle de l'amphotéricine B en présence des stérols et du Triton X-100 (0,2%), dans 10% en volume de méthanol p. 84
- 21- Détermination du coefficient d'extinction molaire des complexes amphotéricine B - cholestérol et amphotéricine B - ergostérol p. 87
- 22- Courbes de la protection biologiques des érythrocytes humains par le cholestérol et par l'ergostérol, contre l'action de l'étrusco-mycine p. 92
- 23- Courbes de la protection biologiques des fungus *Candida albicans* par le cholestérol et par l'ergostérol, contre l'action de l'étrusco-mycine p. 93
- 24- Spectres d'absorption différentielle de l'étrusco-mycine en présence des stérols dans le méthanol . . p. 96
- 25- Spectres d'absorption différentielle de l'étrusco-mycine en présence des stérols dans le propanol . . p. 97
- 26- Courbes des concentrations des complexes étrusco-mycine - cholestérol et étrusco-mycine - ergostérol en fonction des différentes concentrations d'alcools étudiées p. 99

- 27- Détermination du coefficient d'extinction molaire des
complexes étruscomycine - cholestérol et étruscomy-
cine - ergostérol p. 102
- 28- Structures chimiques du cholestérol et de l'ergosté-
rol p. 107

LISTE DES TABLEAUX

- 1- Effet du cholestérol et de l'ergostérol sur le spectre d'absorption de l'amphotéricine B p. 85
- 2- Effet du cholestérol et de l'ergostérol sur le spectre d'absorption de l'étruscomycine p. 100

I

INTRODUCTION

La découverte des antibiotiques, comme arme de combat dans la lutte entreprise par la médecine contre les multiples microorganismes, qui portent atteinte à la santé, a ouvert la voie à un progrès immense, en vue du traitement d'un grand nombre de maladies.

Le terme d'antibiotique dérive d'antibiose (1). Il a été utilisé en 1889 par Vuillemin pour désigner un type d'association de systèmes vivants, dans laquelle un organisme détruit un autre de façon à se maintenir en vie. Papacostas et Gaté limitèrent le sens du terme en appelant "antibiose" le phénomène de destruction d'un organisme par un autre lorsqu'il se produisait "in vitro" et "antagonisme" lorsque le même phénomène se produisait "in vivo".

Les premières observations d'antibiose remontent à 1877; à cette époque, Pasteur et Joubert constatèrent que des "bactéries communes" (aérobie) inhibent la croissance de B. Anthracis, et qu'on évite l'apparition du charbon chez un animal susceptible en injectant en même temps que B. Anthracis, diverses bactéries non pathogènes. En 1885, Babec, à Paris, postulait l'intervention de substances chimiques dans ce phénomène d'inhibition et Duchesne, en 1887, soutenait à Lyon une thèse de médecine dans laquelle il envisage d'éventuelles applications thérapeutiques (1).

D'autres observations d'antibiose ont été faites avant l'année 1929, année où Fleming décrivait l'activité antibactérienne de la pénicilline. Ce n'est cependant qu'en 1940 que Florey, Chain et leurs collaborateurs réussirent à isoler les pénicillines pures et à montrer toutes leurs potentialités.

Un nouveau sens au mot antibiotique fut suggéré par Waksman en 1942, pour désigner une substance chimique d'origine microbienne, qui avait la propriété d'inhiber le développement des micro-organismes. La définition de Waksman est: "Un antibiotique est une substance chimique produite par des micro-organismes, qui a la capacité d'inhiber la croissance des bac-

téries et d'autres micro-organismes".

A cette définition, une spécification fut ajoutée par la suite, c'est que ces substances chimiques doivent agir à une très faible concentration, écartant ainsi du terme antibiotique les acides et les alcools organiques (2).

Cette définition de Waksman est restrictive par le fait qu'elle exclue les antibiotiques d'origine synthétique, qui peuvent avoir la même structure chimique et les mêmes propriétés qu'une substance synthétisée par un organisme vivant. Cette définition est aussi restrictive en limitant l'usage du terme antibiotique aux substances inhibitrices provenant de micro-organismes seulement, car des êtres supérieurs peuvent également synthétiser des antibiotiques (1, 2)

Différentes modifications ont été apportées pour élargir le sens du mot antibiotique de manière à inclure les substances inhibitrices provenant de plantes et d'animaux supérieurs. La définition devient alors: "Les antibiotiques sont des substances chimiques qui sont produites par des organismes vivants et qui ont la propriété d'inhiber la croissance de micro-organismes ou d'autres cellules vivantes".

Ce dernier concept doit être accepté avec réserve, car parmi les produits synthétisés par les plantes se trouvent des alcaloïdes et des tannins, qui pourraient y être inclus, et parmi les produits d'origine animale, le sang et des fluides provenant de certains tissus possèdent aussi des propriétés antimicrobiennes.

Deux autres dates importantes marquent encore le début de l'histoire des antibiotiques, soit l'année 1939, lorsque Dubos a montré qu'il se trouvait dans le sol des micro-organismes producteurs d'antibiotiques (B. Brevis, produisant la tyrothricine), et soit l'année 1944, lorsque Waksman et Schatz découvrirent la streptomycine, ouvrant la voie aux antibiotiques d'actinomycètes.

La grande majorité des antibiotiques qui ont été isolés, aussi bien que ceux pour qui la chimiothérapie a trouvé une application pratique, sont produits par les actinomycètes (2).

En 1948, Brown et Hazen (3) découvrirent que plusieurs milieux étaient antagonistes aux fungus. Ce n'est que deux années plus tard que ces mêmes chercheurs, isolaient le premier antibiotique polyénique, la nystatine (4). Depuis ce

temps, plusieurs centaines d'articles traitant des antibiotiques polyéniques ont été publiés.

Le nombre total des antibiotiques polyéniques est difficile à établir exactement. Plusieurs estimés ont été faits, mais seulement pour ceux dont on avait une documentation chimique raisonnable. En 1977, le nombre d'antibiotiques polyéniques connus était juste au dessous d'une centaine (4, 5)

II

ORIGINE ET PROPRIETES DES ANTIBIOTIQUES POLYENIQUES

1- Structure générale et propriétés

Les polyènes sont presque exclusivement obtenus des membres des "Streptomycetaceae", la majorité est produite par les "Streptomyces", mais une petite minorité l'est par "Streptovorticilium" ou par "Chainia spp" (4, 5)

Les antibiotiques polyéniques forment un groupe qui s'incorpore à la classe des macrolides par leurs propriétés chimiques et biologiques (5). On désigne sous le nom macrolides, un groupe d'antibiotiques constitués par un aglycone de nature lactonique macrocyclique qui peut être lié glycosiquement à une ou deux molécules de sucres; en général, il s'agit de sucres assez spécifiques (1), (voir la figure 4).

Parmi les macrolides, se distinguent quatre sous-groupes: (1)

1 - Les macrolides proprement dits, ils se caractérisent par la présence de nombreux méthyles rattachés au cycle lactonique et par la présence de sucres.

2 - Les substances apparentées aux macrolides, qui ne contiennent pas nécessairement un macrocycle, mais dont le mode de fabrication par le micro-organisme implique des mécanismes similaires à ceux qui donnent naissance aux macrolides.

3 - Les macrolides apparentés, ils sont constitués d'un macrocycle incluant un ou des systèmes cycliques, souvent aromatiques, qui peuvent aussi être accolés au macrocycle; ils sont généralement dépourvus de sucre. Un certain nombre d'entre eux sont désignés sous le nom d'ansamycines.

4 - Les macrolides polyéniques, ils contiennent au moins trois liaisons doubles conjuguées, toutes trans, peu ou pas de ramifications méthyles, souvent de nombreux hydroxyles et parfois ils sont dépourvus de constituant osidique.

Les propriétés générales des antibiotiques polyéniques (6) sont:

1 - Ils possèdent la capacité d'inhiber la croissance d'un grand nombre de fungus, par contre ils n'ont aucune activité sur les bactéries.

2 - Ils sont d'une toxicité relativement élevée lorsqu'ils sont injectés aux animaux, mais ils sont beaucoup moins toxiques lorsque absorbés par voie orale.

3 - Ils sont faiblement solubles dans l'eau, mais se dissolvent mieux dans les solvants organiques polaires.

4 - Ils montrent un spectre d'absorption dans l'ultra-violet, qui est typique des chromophores polyéniques.

2- Chimie et classification des polyènes

Le spectre ultra-violet obtenu à partir des antibiotiques polyéniques représente le trait caractéristique marquant, qui permet d'effectuer une classification rapide et spécifique des antibiotiques polyéniques. Les spectres d'absorption des polyènes ont été normalisés en les comparant aux spectres d'hydrocarbures connus possédant quatre, cinq, six ou sept liaisons doubles conjuguées (5).

Les composés organiques saturés possèdent uniquement des électrons de liaison σ , pour lesquels une transition électronique n'est possible que dans la région hautement énergétique du spectre électromagnétique, soit l'ultra-violet lointain (7). La présence d'insaturation dans la molécule, telle une double

liaison, conduit à la présence de liaison π , dont les énergies de transition de l'état fondamental à l'état excité sont moins élevées que dans le cas d'une liaison σ .

La nature de la transition observée, dans la région spectrale étudiée pour le chromophore polyénique, correspond à une transition $\pi \rightarrow \pi^*$. L'absence d'orbitale "n" sur le chromophore élimine donc d'emblée la possibilité d'une transition $n \rightarrow \pi^*$. Le calcul de la différence d'énergie, mesurée au maximum d'intensité de deux pics voisins, indique que ces bandes d'absorption proviennent des transitions se produisant du niveau fondamental vers les différents niveaux vibrationnels de l'état excité. Cette différence d'énergie, exprimée en nombre d'onde, équivaut à environ 1500 cm^{-1} . Cette valeur d'énergie recoupe les niveaux d'énergie compris dans la région infrarouge du spectre électromagnétique, région qui est caractéristique aux transitions vibrationnelles.

L'augmentation du nombre de liaisons doubles conjuguées à l'intérieur d'une molécule conduit à un déplacement bathochrome de plus en plus grand, c'est-à-dire un déplacement des pics d'absorption vers les longueurs d'ondes plus grandes. Ainsi, les triènes sont des composés incolores ou d'un jaune

très pâle, les tétraènes, tels la nystatine, la rimocydine et la pimaricine sont jaunes pâles, les pentaènes sont jaunes et les heptaènes sont d'un jaune encore plus prononcé (5).

Le spectre ultra-violet d'un antibiotique polyènique, permet non seulement, d'identifier qu'il s'agit bien d'un polyène, mais spécifie aussi le nombre de liaisons doubles conjuguées, et cela par la position des bandes d'absorption. La spectroscopie ultra-violet permet aussi d'identifier les subdivisions à l'intérieur d'un groupe, tels les pentaènes. La présence d'un groupement méthyle adjacent à un chromophore polyènique mène à un déplacement bathochromique du maximum d'absorption d'environ six nanomètres, alors qu'un groupement cétone adjacent au chromophore polyènique, transforme radicalement le spectre (4, 5, 8)

La façon généralement utilisée pour classifier les antibiotiques polyéniques est en premier lieu, par le nombre de doubles liaisons conjuguées qu'ils contiennent et en second lieu par la présence d'un sucre hexosamine ou d'un cycle aromatique, à l'intérieur de leur structure. La présence de sucre est une des caractéristiques des antibiotiques macrolides.

La structure de l'aminosucrose présent dans les antibiotiques polyéniques a été chimiquement déterminée, il s'agit, sauf une exception, de la mycosamine (9,10) . La périmycine fait exception en possédant la pérosamine comme aminosucrose, il s'agit en fait d'un isomère de la mycosamine (11, 12). La présence de la mycosamine ou de la pérosamine confère à la molécule du polyène un caractère basique. Plusieurs antibiotiques polyéniques, tels l'amphotéricine B et la nystatine sont amphotères et possèdent un même nombre de groupements acides et basiques. Il y en a aussi d'autres, qui ne possèdent pas de groupement ionisable, tel la filipine. Ces derniers sont donc moins polaires. Certains membres du groupe des heptaènes contiennent une amine aromatique (4).

3- Solubilité des antibiotiques polyéniques

Les antibiotiques polyéniques sont amphiphiles, c'est-à-dire qu'ils possèdent une partie polaire et une autre partie apolaire. La partie polaire est formée principalement d'hydroxyles qui sont majoritairement fixés sur un même côté du macrolide, alors que la série de liaisons doubles conjuguées, qui est le chromophore de la molécule, forment la partie non-po-

laire, de l'autre côté du macrolide.

La solubilité diminue alors qu'augmente le caractère hydrophobe de l'antibiotique polyénique, c'est-à-dire que les tétraènes sont plus solubles que les heptaènes. Les antibiotiques polyéniques sont peu solubles dans l'eau et les solvants organiques tels les cétones et les éthers. Ils sont beaucoup plus solubles dans les solvants organiques polaires, tel le diméthyle formamide, et les solvants organiques dipolaires aprotiques, tel le diméthyle sulphoxide.

Les solutions d'antibiotiques polyéniques, en milieu organique polaire, peuvent être diluées avec de l'eau et donner des solutions stables, si la concentration finale après dilution, demeure inférieure à environ 5×10^{-5} M. Ce type de solution ne peut être dialysé et n'est pas considéré comme étant une vraie solution, mais comme des micelles en milieu aqueux (4).

4- Stabilité des antibiotiques polyéniques

Les antibiotiques polyéniques sont généralement considérés comme étant peu stables à la chaleur, à la lumière, à l'air et aux valeurs extrêmes de pH (4, 13). La sensibilité à l'air

et à la lumière est reliée principalement à une modification du chromophore polyènique. Tingstad et Garret ont confirmé, que la perte d'activité biologique de la filipine solide exposée à l'air était accompagnée d'une diminution d'absorption du chromophore pentaène à 355 nm (14). De même qu'une étude menée par Dekker et Ark (15) montre que l'irradiation d'une solution aqueuse ou alcoolique (méthanol) de pimaricine (100 PPM) durant une période de deux minutes et à une distance de 12 pouces d'une lampe d'ultra-violet, provoque une très forte diminution d'absorption. Cependant l'addition de colorant, tel le chlorophyllin de sodium et de potassium, qui est un dérivé de la chlorophylle et qui est plus soluble dans l'eau que cette dernière, protège dans une large mesure la pimaricine contre l'irradiation ultra-violet. D'autres colorants, tels le triphényle méthane et la quinoneimine, possèdent une bande d'absorption dans la région de 300 à 400 nm. Ils apportent aussi une protection à la pimaricine, qui montre une absorption dans cette région (15).

L'addition d'antioxydant prolonge la vie active de la nystatine, de la filipine, de la lagosine et de la pimaricine (4, 15). Il a été suggéré par Dekker et Ark (15), que

lors de l'absorption de lumière par les antibiotiques polyéniques, il se produit une isomérisation cis-trans. L'inactivation des antibiotiques s'expliquerait par la grande différence des propriétés entre les isomères cis et les isomères trans.

Il a été démontré qu'une solution d'amphotéricine B peut être conservée pendant une journée sans aucune protection contre l'air, la lumière et la température ambiante, et conserver sa bioactivité (16, 17). Sous forme solide sèche, les antibiotiques polyéniques sont relativement stables.

III

MECANISME D'ACTION DES ANTIBIOTIQUES POLYENIQUES

1- Interaction avec les stérols

Deux observations d'importance, faites en 1958, ont permis de mieux saisir le mécanisme d'action des antibiotiques polyéniques. On a démontré, que la nystatine endommage la membrane des fungus, de telle façon que le contenu cellulaire de faible poids moléculaire s'échappe de la cellule, alors que les substances de poids moléculaires élevés y restent (18). On a aussi montré que l'addition de stérol à un milieu de croissance protégeait les fungus contre l'attaque des antibiotiques polyéniques (19, 20).

Des travaux plus récents ont montré que l'activité antifongique des antibiotiques polyéniques sur les cellules, provient de l'effet de la combinaison de l'antibiotique polyénique avec

les stérols contenus dans la membrane de la cellule, ce qui altérerait les propriétés de perméabilité sélective de la membrane, conduisant à l'écoulement vers l'extérieur de la cellule des substances essentielles à sa survie.

Les cellules eukariotes, ce qui comprend les fungus, les protozoaires, les algues vertes, les limaçons, les moisissures de limon et les "vers planaires" , absorbent les antibiotiques polyèniques, ce qui leur est fatal. Les cellules prokariotes, tels les bactéries et les algues bleue-vertes, absorbent peu les polyènes et ne sont donc pas affectés par eux. La différence de comportement des antibiotiques polyèniques pour ces deux types d'organismes s'explique par la présence de stérol à l'intérieur de la membrane des organismes eukariotes, alors qu'ils sont absents de la membrane des organismes prokariotes.

L'incorporation de stérols à des organismes n'en requiert pas, mais qui cependant les inserrent dans leur membrane lorsque le milieu de croissance en contient, a permis de vérifier l'influence de la présence des stérols sur l'action des antibiotiques polyèniques (21, 22). On a observé que les organismes qui contenaient des stérols dans leur membrane, subissaient une inhibition de croissance et la lyse. Les mêmes

organismes, qui par contre, ne contenaient pas de stérols dans leur membrane ne subissaient pas de diminution de croissance malgré la présence d'antibiotique polyènique. Le fait d'augmenter la concentration de stérol dans la membrane de "Candida albicans", conduit à une augmentation de la sensibilité de l'organisme envers les antibiotiques polyèniques (23).

Des études ont montré, que les antibiotiques polyèniques, en plus de se lier avec les stérols, se liaient aussi avec les phospholipides, et que la présence de stérol n'est pas nécessaire pour que se produise une interaction entre les phospholipides et les antibiotiques polyèniques (24, 25, 26). Les acides gras procurent une protection contre l'action antifongique des antibiotiques polyèniques, de plus la mesure de la diminution de l'intensité d'absorption du premier pic de leurs spectres, permet dans la plupart des cas d'évaluer qualitativement la protection apportée aux fungus par les acides gras (27).

L'addition de stérols à une solution d'antibiotiques polyèniques provoque aussi une diminution de l'intensité d'absorption du spectre des antibiotiques polyèniques (20).

2- Rôle des stérols dans les membranes eukariotes

Les stérols sont présents dans les cellules et dans les membranes internes de la plupart des organismes eukariotes, par contre le rôle des stérols à l'intérieur des membranes n'est pas encore clair (4). Les membranes de certains organismes peuvent fonctionner avec ou sans stérols (achoeleplasma) ou sans stérols du tout (la plupart des prokariotes) par contre, pour la majorité des organismes eukariotes, la présence de stérol est essentielle au fonctionnement normal de la membrane.

La présence de cholestérol dans la membrane cellulaire, modifie la fluidité des chaînes hydrocarbonées des phospholipides, en modifiant le réseau formé par les chaînes hydrocarbonées en phase de gel et en diminuant la flexibilité des chaînes en phase liquide-cristalline (4).

L'incorporation de stérol dans une membrane de phospholipides se produit sans être influencée par la composition en acides gras et inversement, sans influencer la composition en acides gras des phospholipides. Des études en monocouche et par calorimétrie de divers mélanges de cholestérol

et de phospholipides indiquent que la nature des têtes polaires des phospholipides n'est pas responsable de l'interaction lipide-stérol. Bien que plusieurs types de stérols puissent être incorporés dans une membrane, essentiellement ceux possédant un groupement hydroxyle en position 3- β et une structure relativement plane, influencent le fonctionnement membranaire (28). L'addition de 3- β hydroxystérol à une membrane lipidique cause un ralentissement considérable du transport ionique, alors que la perméabilité générale de la membrane diminue de façon marquée (6, 29).

La calorimétrie différentielle montre que le cholestérol diminue l'énergie associée à la transition de phase thermotropique des phospholipides et déplace la transition à des températures inférieures (30). Ces changements de propriétés physiques ne sont pas observés avec les 3- α hydroxystérols (29, 31).

Les organismes tels les fungus possèdent dans leur membrane de l'ergostérol au lieu du cholestérol, comme c'est le cas pour les cellules des mammifères. Lorsqu'une membrane contenant des stérols, substances qui créent un ordre plus grand

dans la membrane, entre en contact avec un antibiotique polyénique, il se produit des interactions préférentielles avec les stérols de la membrane et le polyène, conduisant à des changements importants des propriétés de perméabilité de la membrane (4).

3- Formation de pores

Le traitement de membranes contenant du stérol avec l'amphotéricine B ou la nystatine, provoque une diminution de la résistance électrique de la membrane et une augmentation de la perméabilité ionique transmembranaire, cependant ces antibiotiques n'affectent pas la stabilité de la membrane. Le transport d'ions et de substances non-électrolytes à travers la bicouche lipidique s'explique par la formation de pores ou de canaux provenant de l'association des antibiotiques polyéniques avec les stérols contenus dans la bicouche lipidique. Les pores ainsi formés ne sont pas des pores statiques, mais ils se forment pour un court instant et disparaissent. La grosseur de ces pores peut être estimée par la grosseur des molécules, qui s'échappent du milieu interne de la bicouche lipidique. Les pores formés par l'amphotéricine B sont estimés avoir un rayon interne de 7 à 10,5 Å (32), alors que ceux formés par la nystatine sont estimés avoir entre 4 à 7 Å de rayon

interne (4).

a) Complexe Amphotéricine B-cholestérol

Différents modèles de pores ont été proposés pour l'amphotéricine B (26, 33, 34, 35), car c'est le seul antibiotique polyénique, dont la stéréochimie est parfaitement connue (4). Les modèles proposés sont habituellement constitués de 8 à 10 molécules d'amphotéricine B et d'environ le même nombre de molécules de cholestérol. L'intérieur de ce complexe est hydrophyle par la présence de groupements hydroxyles liés sur un côté de la molécule d'amphotéricine B, et l'extérieur du complexe est par conséquent hydrophobe, et est formé par la série de 7 liaisons doubles conjuguées de l'amphotéricine B, et le cholestérol.

La longueur de la molécule amphotéricine B est environ la même qu'une molécule de lécithine ou de cholestérol (20 à 24 Å), ce qui implique qu'une pore traversant une bicouche doit être constituée de deux unités du complexe amphotéricine B-cholestérol (demi-pore), les deux unités ou demi-pores se trouvant respectivement d'un côté et de l'autre de la bicouche. De telles demi-pores se déplaceraient indépendamment à l'intérieur du film lipidique; un pore complet se

forme lorsque deux demi-pores, situées de chaque côté de la membrane, s'approchent et se lient. L'orientation de ce type de complexe doit être perpendiculaire au plan de la membrane. Cette orientation est énergétiquement favorisée par le contact de la partie hydrophobe du complexe, avec les chaînes hydrocarbonées de la couche lipidique. De cette façon, les sites hydrophiles des molécules d'amphotéricine B se trouvent toutes dirigées vers l'intérieur et les sites hydrophobes vers l'extérieur, tout ceci conduisant à la formation d'un complexe d'une grande stabilité (35), tel qu'illustré à la figure 1.

b) Complexe Nystatine-cholestérol

La structure de la nystatine est presque identique à celle de l'amphotéricine B, la différence étant un changement de la position d'un groupement hydroxyle dans la partie hydrophyle de la molécule et une interruption de la conjugaison causée par l'absence d'une liaison double. La partie hydrophobe se trouve ainsi séparée en deux et quatre liens doubles. L'interruption de la conjugaison permet une torsion de la molécule, qui n'est pas possible pour l'amphotéricine B.

Les effets de la nystatine et de l'amphotéricine B sur les

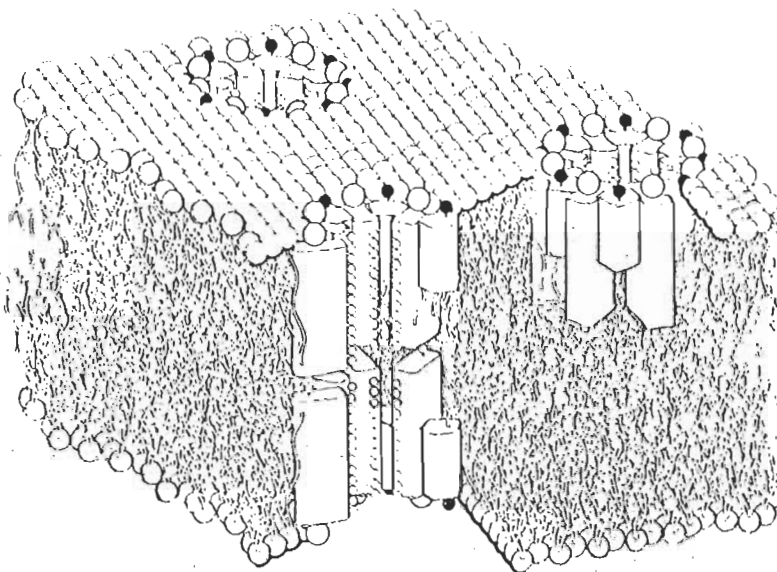


Figure 1. Modèle de demi-pore proposé par De Kruijff et Demel pour l'amphotéricine B et le cholestérol. La figure illustre la section transversale d'une pore formée de deux demi-pores à l'intérieur d'une membrane lipidique

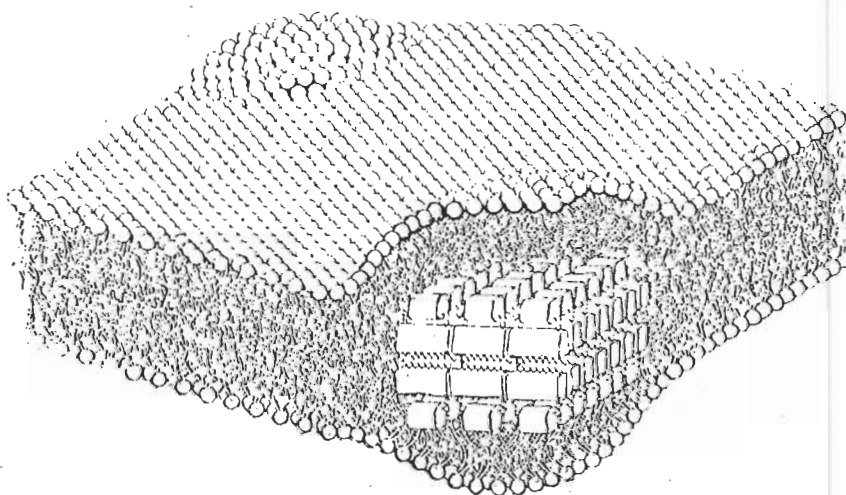


Figure 2. Représentation schématique du complexe filipine-cholestérol, à l'intérieur d'une bicouche lipidique. De Kruijff et Demel ont proposé ce modèle de complexe pour la filipine et le cholestérol.

membranes biologiques et les liposomes étant particulièrement semblables (35), le même type de complexe que l'amphotéricine B, a été proposé pour la nystatine. La pore formée par le complexe nystatine-cholestérol serait plus petite, que celle du complexe amphotéricine B-cholestérol (35, 36), ceci à cause de la torsion possible de la partie hydrophobe de la molécule.

c) Complexe Filipine-cholestérol

La filipine possède un trait caractéristique, le distinguant des autres antibiotiques polyéniques. La filipine est une molécule neutre, qui ne possède pas de groupements chargés, tel un carboxyle ou un groupement mycosamine, comme la plupart des antibiotiques polyéniques.

Le complexe filipine-cholestérol proposé par De Kruijff et Demel (35), ne formerait pas une pore, comme ils le suggèrent pour l'amphotéricine B et la nystatine, mais formerait un agrégat de 150 à 250 Å, visible par microscopie électronique, et dont l'orientation serait parallèle au plan de la membrane. Une telle orientation permettrait l'association d'agrégats, produisant ainsi un sandwich, dont le centre serait formé par la partie hydrophile de la filipine et l'extérieur

par sa partie hydrophobe, celle-ci étant en interaction avec le cholestérol. Ce sandwich, constituant le complexe filipine-cholestérol, se situerait au centre de la partie hydrophobe de la membrane, provoquant la formation d'une protubérance, ce qui conséquemment conduirait à la rupture de la membrane, tel qu'illustré à la figure 2.

4- Pertinence des modèles proposés

Les modèles de pores traversant la bicouche de phospholipides, qui forment la membrane cellulaire, sont séduisants, cependant la validité de tels modèles a été mise en doute (26). Certains chercheurs ont suggéré, bien que la présence de stérol soit requise pour que se produise une interaction entre les antibiotiques polyéniques et la membrane cellulaire, que leur présence ne confère pas nécessairement à une membrane, la sensibilité aux antibiotiques polyéniques. Le degré d'ordre à l'intérieur de la bicouche lipidique serait relié à la sensibilité de la membrane aux antibiotiques polyéniques. L'addition de cholestérol amenant une augmentation de l'ordre dans le milieu, conduirait à une augmentation de la sensibilité de la membrane envers les antibiotiques polyéniques (25).

Les modèles présentés pour l'amphotéricine B et la nystatine exigent la présence d'antibiotique de chaque côté de la membrane, c'est-à-dire à l'extérieur et à l'intérieur de cette dernière. Lorsque des cellules sont mises en présence d'un antibiotique polyénique, ce n'est que de l'extérieur que celui-ci peut attaquer les cellules. Il semble improbable, mais non impossible qu'un phénomène de flip-flop intervienne, permettant à l'antibiotique d'agir sur la couche interne de la membrane cellulaire (37).

Certains chercheurs suggèrent la possibilité de l'existence de deux différents types de pores, car la sélectivité ionique est différente selon que l'antibiotique polyénique est ajouté d'un seul côté de la membrane ou bien des deux côtés de la membrane. L'addition de l'antibiotique polyénique d'un seul côté de la membrane conduit à une sélectivité cationique, alors que l'addition des deux côtés de la membrane montre une sélectivité anionique (26).

Marty et Finkelstein (26) proposent une explication à ce phénomène. L'épaisseur de la bicouche de phospholipides n'étant pas uniforme en tout point, il s'ensuit que le demi-pore formé par le complexe amphotéricine B-stérol ou nysta-

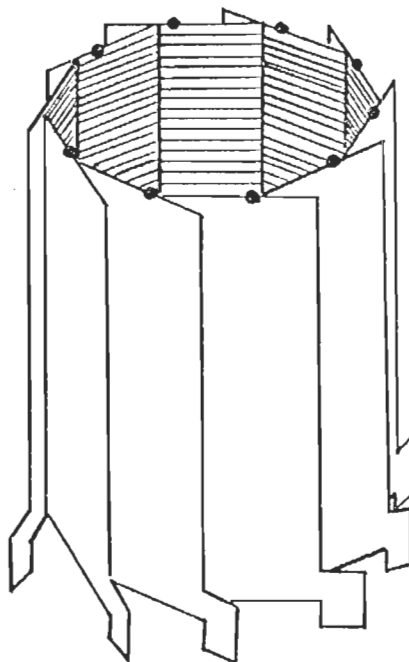


Figure 3. Modèle de demi-pore proposé par Marty et Finkelstein, où les molécules d'amphotéricine B sont schématisées comme étant des plans dotés d'une protubérance et d'un point. La protubérance représente l'aminosucres mycosamine et le point représente l'hydroxyle situé à l'extrémité non-polaire de la molécule. L'intérieur de la demi-pore est hydrophyle et est représentée par la partie ombragée, alors que l'extérieur de la demi-pore est hydrophobe. Le milieu aqueux extérieur est en contact avec le bas du modèle, alors que le milieu de la membrane (ou la phase aqueuse intérieure) est en contact avec le dessus du modèle.

tine-stérol, qui est environ de la même longueur que les molécules de phospholipides, pourrait traverser complètement la membrane en certains endroits, là où l'épaisseur membranaire serait d'environ la longueur d'une molécule de phospholipide. La pore ainsi formée, à partir de l'addition de l'antibiotique d'un seul côté de la membrane, ne serait pas identique à celle formée par deux demi-pores, formées lorsque l'antibiotique est ajouté des deux côtés de la membrane, et expliquerait la différence de propriétés de sélectivités ioniques observées lors de l'addition de l'antibiotique, soit d'un seul côté ou soit des deux côtés de la membrane, (voir la figure 3).

Il est probable, que ces modèles subiront des modifications, de façon à mieux représenter les rôles joués par les stérols, les phospholipides et peut être les protéines. Ils représentent un premier pas vers une interprétation rationnelle du comportement des antibiotiques polyéniques dans les membranes.

5- Objectifs du présent travail

L'état des connaissances sur le comportement et les propriétés des antibiotiques polyéniques a beaucoup évolué depuis

leur découverte. Bien qu'elles soient encore à prouver, des hypothèses intéressantes sur le mode d'action des antibiotiques polyéniques ont été développées. Toutefois, aucune méthode analytique, visant à déterminer le degré d'interaction entre les antibiotiques polyéniques et les stérols, n'avait été développée jusqu'à maintenant.

Le présent travail a eu pour premier objectif de développer une méthode analytique, permettant d'évaluer le degré d'interaction d'un antibiotique polyénique pour le cholestérol et pour l'ergostérol, en déterminant la concentration des complexes qui se forment à l'intérieur de milieux différents.

Le second objectif du travail fut d'utiliser cette méthode analytique, appuyée par une méthode biologique, pour lever la controverse existant au sujet de l'affinité préférentielle de l'étruscomycine pour l'un des deux stérols étudiés.

La structure de l'étruscomycine possède des particularités intéressantes, qui s'approchent par certains points à celles de l'amphotéricine B, qui se lie préférentiellement à l'ergostérol, et de la filipine, qui se lie préférentiellement au cholestérol. Les particularités auxquelles il est fait allu-

sion, sont la présence, sur le macrocycle de l'étruscomycine, de l'aminosucrose mycosamine, qui se trouve aussi lié au macrocycle de l'amphotéricine B, et la présence d'une partie hydrophobe s'apparentant à celle de la filipine.

L'étruscomycine, ayant une structure aussi particulière, pourrait permettre de déterminer l'importance des rôles joués par la mycosamine et par la longueur de la partie hydrophobe, à l'intérieur d'un antibiotique polyénique, dans l'attribution d'une affinité préférentielle pour le cholestérol ou pour l'ergostérol. La découverte que l'étruscomycine montre une affinité préférentielle pour l'ergostérol, confirmerait, dans une certaine mesure, que l'aminosucrose mycosamine, confère aux antibiotiques polyéniques une affinité préférentielle pour l'ergostérol, alors que la découverte que l'étruscomycine montre une affinité préférentielle pour le cholestérol, confirmerait le rôle prépondérant joué par la longueur de la partie hydrophobe des antibiotiques polyéniques.

La spectroscopie différentielle constitue une nouvelle technique d'approche du problème de l'interaction des antibiotiques polyéniques avec les stérols. Dans le but de vérifier l'exactitude des résultats obtenus par spectroscopie différen-

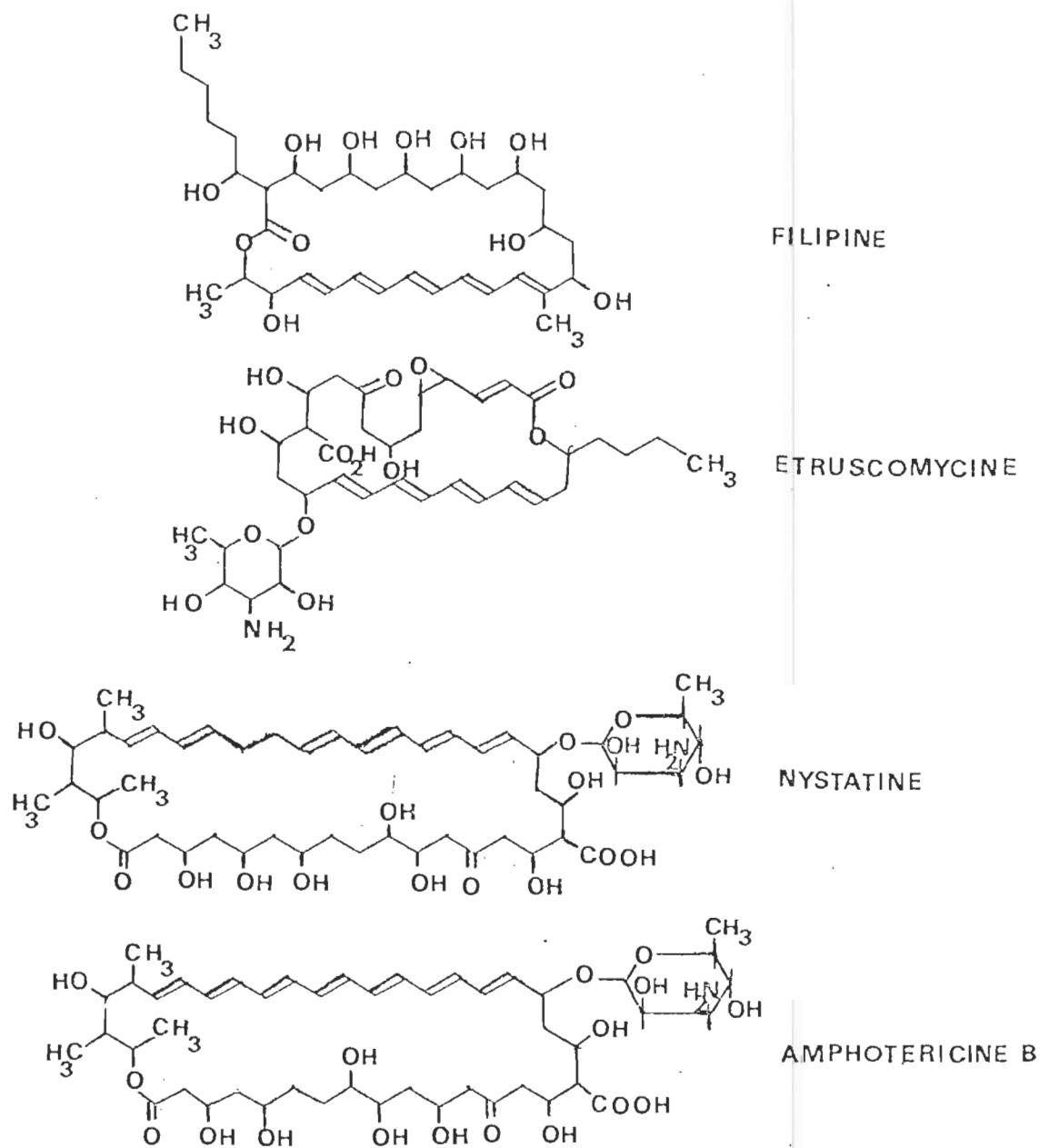


Figure 4. Structures chimiques de la filipine, l'étruscomycine, la nystatine et l'amphotéricine B.

tielle, une étude biologique de l'affinité des antibiotiques polyéniques pour le cholestérol et pour l'ergostérol a été effectuée, avec quelques antibiotiques polyéniques, sur deux types différents de cellules.

IV

PARTIE EXPERIMENTALE

1- Produits

Les antibiotiques polyèniques, qui ont été utilisés lors des essais expérimentaux furent gracieusement fournis par la section des maladies infectieuses du département de médecine de l'université "Washington University School of Medicine ", à St-Louis au Missouri. Le cholestérol de grade "certified" provenait de chez "Fischer Chemicals", Montréal, Québec, alors que l'ergostérol d'une pureté de 95 % a été acheté de la compagnie "Sigma", à St-Louis, Missouri. Ce dernier a été recristallisé dans l'éthanol deux fois. Le diméthyle sulfoxyde de grade "reagent" a été acheté de "BDH Chemicals", le méthanol de grade "certified" a été acheté chez "Fischer Chemicals" et le propanol de grade "reagent" a été acheté chez "J.T. Baker"

2- Essais spectroscopiques

La procédure de préparation des solutions d'antibiotiques polyéniques a toujours été la même pour tous les antibiotiques étudiés. Une solution mère, de concentration molaire 5×10^{-5} M, était préparée de la façon suivante: la masse pesée précisément à $\pm 0,00002$ g, sur une balance Mettler H54AR, était dissoute dans 1,00 ml de diméthyle sulfoxyde. La solution ainsi formée était ensuite transférée dans un ballon jaugé de 100,00 ml, et le volume de liquide amené au trait de jauge avec de l'eau déminéralisée et distillée. Le volume de la solution était complété dans un bain thermostaté, dont la température était ajustée à 20°C. Les solutions d'antibiotiques polyéniques étaient conservées à 4°C, lorsque non utilisées, et cela pour une période ne dépassant pas deux jours.

Les solutions de cholestérol et d'ergostérol, ont été préparées dans deux solvants différents, soit le méthanol et le propanol. Chaque solution de stérol a été préparée en transférant une masse précisément pesée à $\pm 0,00002$ g sur une balance Mettler H54AR, de stérol en poudre dans un ballon jaugé et en ajustant le volume au trait de jauge avec l'alcool choisi, ceci à la température de 20°C. Cette solution dont la concen-

tration était de 1×10^{-3} M, subissait une dilution d'un rapport de 1/10, abaissant la concentration à 1×10^{-4} M, ceci étant effectué à 20°C. Les solutions de stérols étaient conservées à 4°C lorsqu'elles n'étaient pas utilisées et cela pour une durée maximale d'une semaine. Aucun changement visible des solutions n'a été observé durant la semaine d'utilisation.

Le rapport stérol:antibiotique a constamment été fixé à 1. Les différentes solutions contenant divers taux d'alcool dans l'eau furent toutes préparées à partir de solutions maintenues à une température de 20°C.

Les spectres différentiels ont été obtenus en préparant une série de quatre solutions possédant toutes le même pourcentage d'alcool et ayant connues le même ordre d'addition de leurs constituants. Cette série de quatre solutions se compose d'une solution de l'antibiotique polyénique, d'une solution du stérol, d'une solution aqueuse d'alcool, et d'une solution où l'antibiotique et le stérol sont mis en présence l'un de l'autre.

En spectroscopie différentielle, les deux faisceaux lumineux du spectrophotomètre doivent rencontrer sur leurs parcours respectifs, la même quantité de molécules de chacune des espè-

ces, ceci dans le but d'observer sur les spectres, les variations d'absorbance attribuables uniquement à l'interaction du stérol avec l'antibiotique et non pas celles engendrées par une différence des quantités de molécules rencontrées par chaque faisceau. La concentration finale des différents antibiotiques et des stérols, à l'intérieur des solutions dont le spectre différentiel a été mesuré, a toujours été fixée à 1×10^{-5} M. Un délai était généralement aloué entre la prise des spectres et la préparation des solutions pour permettre au système d'atteindre l'équilibre. Ce délai variait, selon les antibiotiques, de 15 à 120 minutes.

Pour obtenir des résultats, qui soient comparables et reproductibles d'une expérience à l'autre, il est important de porter attention à l'ordre d'addition des constituants, d'agiter vigoureusement les solutions mères servant à préparer les solutions dont les spectres seront mesurés, de respecter un délai relativement constant entre la préparation des solutions et la prise de leur spectre, et de n'utiliser que des solutions d'antibiotiques qui soient fraîches.

a) Spectres différentiels

L'appareil utilisé pour prendre les diverses mesures d'absorbance était le Cary 17 D. Les spectres différentiels ont été mesurés en insérant les solutions requises dans le spec-

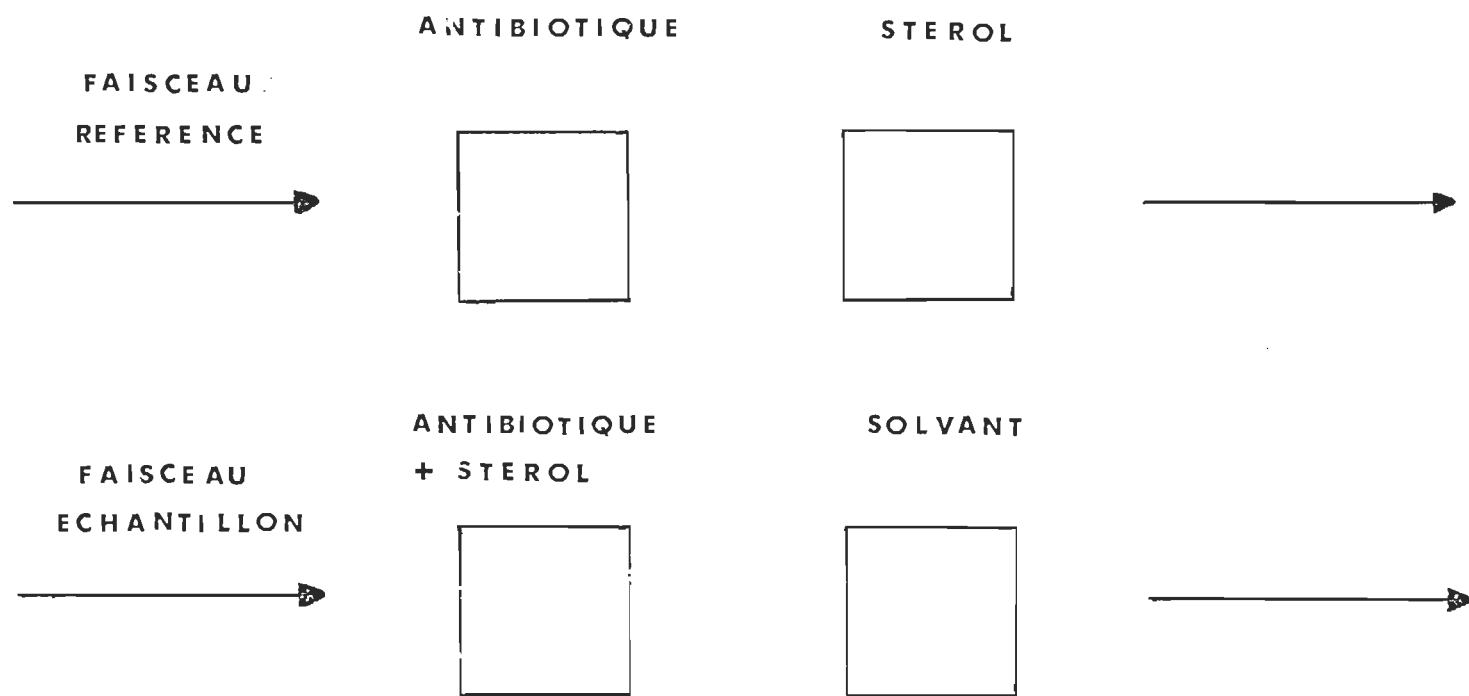


Figure 5. Schéma représentant la disposition des différentes solutions dans le spectrophotomètre, lors de mesures spectroscopiques différentielles.

trophotomètre, à l'intérieur de porte-cellules spéciaux où deux cellules peuvent être traversées par le faisceau optique de l'appareil, tel qu'illustré sur le schéma de la figure 5 . La solution contenant l'antibiotique et le stérol, ainsi que la solution aqueuse d'alcool, sont installées l'une derrière l'autre dans le faisceau du compartiment de l'échantillon, alors que les solutions du stérol et le l'antibiotique, le sont dans le faisceau du compartiment de référence. Comme ce qui est mesuré par l'appareil est une différence d'absorbance, qui peut être soit positive ou soit négative, la plume traçant le spectre est déplacée, avant la prise du spectre, au centre de sa course sur le papier. L'échelle d'absorbance 0-1,0 fut l'échelle généralement utilisée pour les mesures d'absorbance différentielle.

3- Détermination des coefficients d'extinction molaire

a) Antibiotiques polyéniques

Les coefficients d'extinction molaire des antibiotiques polyéniques ont été mesurés dans du propanol, en utilisant des supports de cellules thermostatés à 20°C. Ils ont été

mesurés à 408 nm pour l'amphotéricine B et à 319 nm pour l'étruscomycine. Le choix de ces longueurs d'ondes a été motivé par la présence d'un pic d'absorption attribuable aux espèces libres des antibiotiques polyéniques mentionnés.

Les solutions ont été préparées en dissolvant une masse précisément connue à $\pm 0,00002$ g de l'antibiotique polyénique, dans 2,00 ml de diméthyle sulfoxyde. La solution ainsi formée est ensuite transférée dans un ballon jaugé de 100,00 ml, et le volume est complété au trait de jauge avec du propanol, à une température de 20°C. A partir de cette solution, différentes dilutions sont effectuées et le spectre de ces solutions est mesuré. L'intensité d'absorbance de ces différentes solutions, est ensuite portée en fonction de leur concentration en antibiotique, sous forme de graphique. La pente de la courbe ainsi obtenue, correspond à la valeur du coefficient d'extinction molaire de l'antibiotique libre, puisque les concentrations d'antibiotiques polyéniques utilisées sont suffisamment petites, pour que soit respectée la loi de Beer-Lambert, ce qui signifie que l'antibiotique polyénique ne se trouve pas sous forme agrégée mais sous forme libre. Les figures 6 et 7 représentent les courbes obtenues respectivement pour l'amphotéricine B et l'étruscomycine.

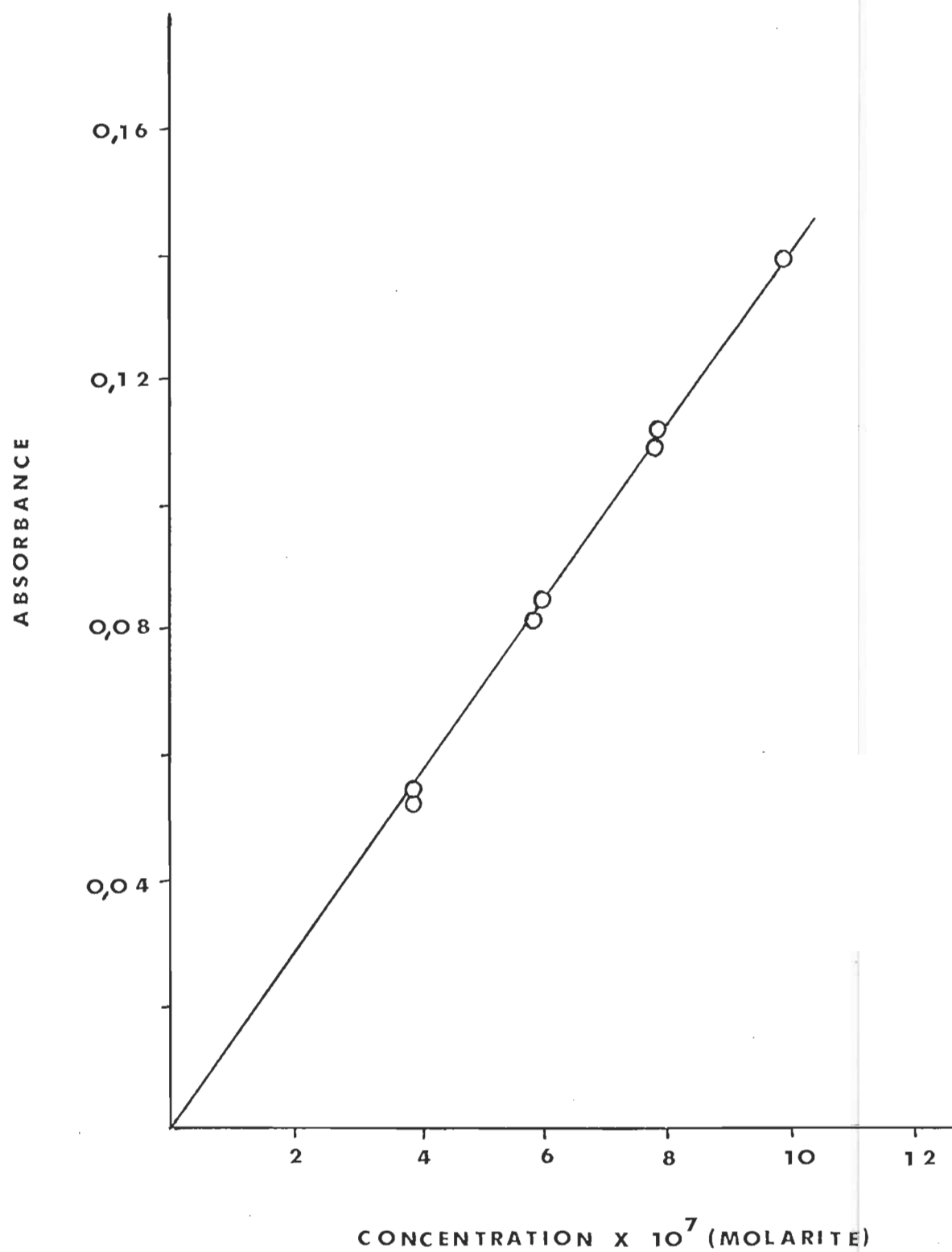


Figure 6. Détermination du coefficient d'extinction molaire de l'amphotéricine B dans le propanol, à 408 nm.

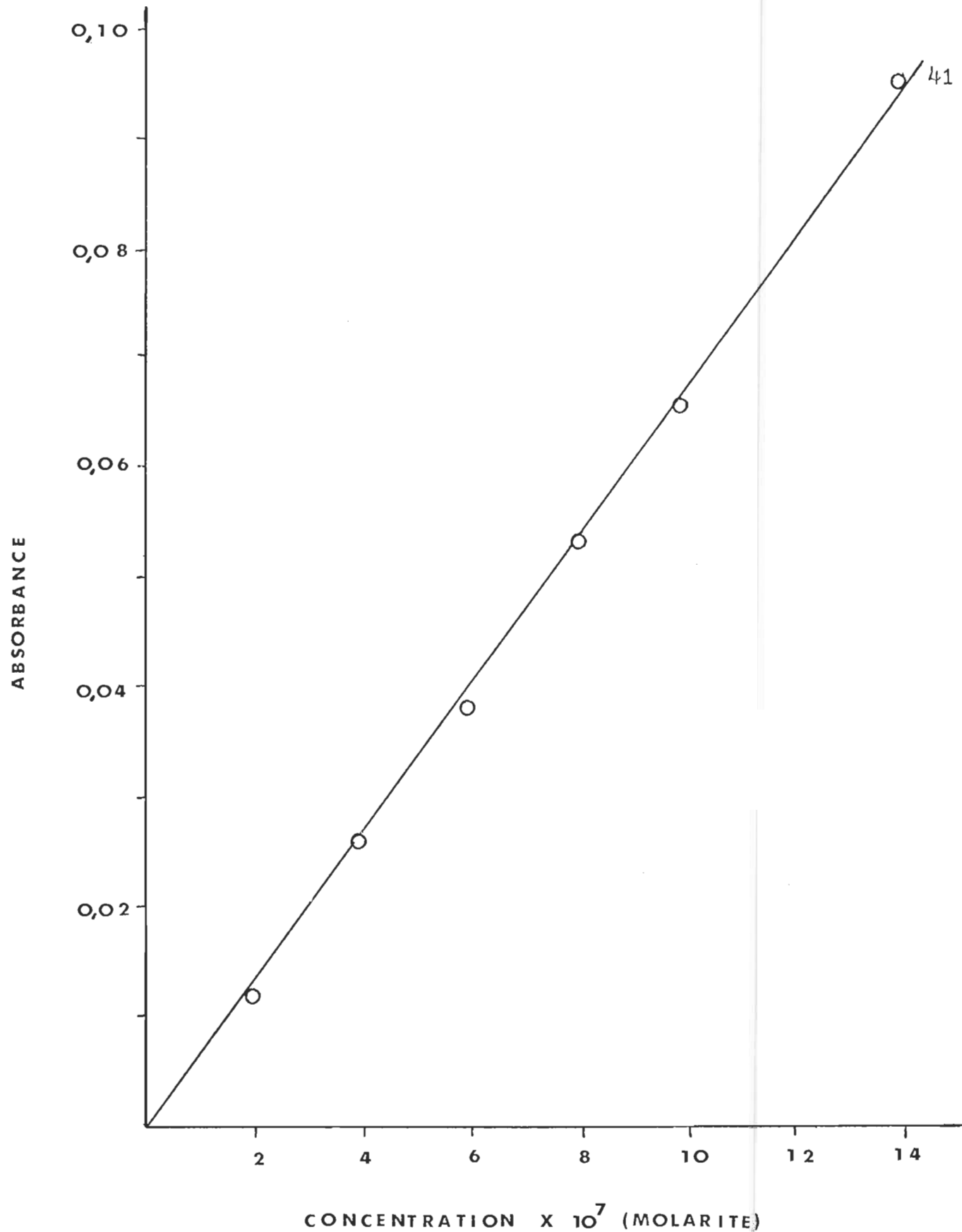


Figure 7. Détermination du coefficient d'extinction molaire de l'étruscomycine dans le propanol, à 319 nm.

b) Complexes antibiotique-stérol

Les coefficients d'extinction molaire des complexes antibiotique-stérol ont été déterminés à 408 nm pour l'amphotéricine B et à 319 nm pour l'étruscomycine, et cela avec le cholestérol et l'ergostérol. Le choix de ces longueurs d'ondes a été effectué parce que le calcul de la concentration de complexe antibiotique-stérol est basé sur la diminution d'absorbance causée par la disparition de l'espèce libre des antibiotiques polyéniques, qui absorbent à ces longueurs d'ondes, et sur l'augmentation d'absorbance provenant de la formation du complexe antibiotique-stérol.

Les coefficients d'extinction molaire des complexes antibiotique-stérol ont été évalués en mesurant l'absorbance d'une série de solutions possédant divers rapports antibiotique:stérol. En portant en graphique l'intensité d'absorbance à la longueur d'onde choisie pour l'antibiotique, en fonction du rapport molaire antibiotique:stérol, la valeur du coefficient d'extinction molaire est obtenu en prenant l'absorbance au point de rencontre avec l'abscisse, là où la concentration en stérol tend vers l'infini, et en la divisant par la concentration de l'antibiotique, pour lequel on pose qu'il se trouve essentiellement sous forme complexée avec le stérol.

La concentration d'alcool demeure la même pour toutes les solutions, soit 15 % pour les solutions d'étruscomycine et 17 % pour les solutions d'amphotéricine B. Le choix de celles-ci est motivé par l'évidente nécessité, d'observer une formation importante de complexe dans le milieu.

4- Essais biologiques

Les expériences biologiques furent effectuées sur deux types de cellules, soit les cellules *Candida albicans* et les érythrocytes humains.

Les cellules *Candida albicans* ont été obtenues du Dr. L. Halay, du "Center for disease Control, Atlanta, GA", et furent incubées pour une nuit dans un milieu de Sabouraud liquide, à 37°C. Les cultures furent ensuite diluées 1:3 avec un milieu Sabouraud frais et incubées 1,5 heure à 37°C, récupérées par centrifugation, rincées une fois avec du PBS, qui est une solution tampon de phosphate de sodium 10 mM, de pH 7,4, et comptées avec un hémocytomètre.

Les érythrocytes provenant de donneur normal, ont été séparés de l'EDTA, qui sert d'anticoagulant, lavés avec une solution de chlorure de sodium 0,155 M tamponnée avec du

phosphate de sodium 10 mM de pH 7,4, dispersés avec du PBS et comptés avec un hémocytomètre.

La cellule *Candida albicans* est un type de fungus, dont le principal stérol membranaire est l'ergostérol (38, 39) contrairement aux érythrocytes, pour qui le cholestérol est le principal stérol membranaire (40).

L'affinité d'un antibiotique vis-à-vis chaque stérol, c'est-à-dire le cholestérol et l'ergostérol, a été évaluée en mesurant la protection apportée par chacun d'eux, contre l'action de l'antibiotique, lorsqu'ils sont ajoutés au milieu où baignent les cellules. La quantité de stérol ajoutée au milieu varie de façon à obtenir plusieurs rapports antibiotique: stérol, ce qui permet d'évaluer qualitativement l'avidité d'un antibiotique polyénique pour chaque stérol.

Le phénomène de protection biologique consiste à permettre la formation du complexe antibiotique-stérol dans le milieu, avant l'addition des cellules. Si l'antibiotique se lie au stérol présent dans le milieu où baignent les cellules, il en résultera une diminution de la concentration d'antibiotique susceptible d'attaquer les cellules, de là le terme de protection biologique de la part des stérols.

L'action des antibiotiques polyéniques sur les cellules consiste à modifier la perméabilité de leur membrane de manière telle, que le contenu cytoplasmique de faible poids moléculaire s'échappe de la cellule. Cette action peut donc être évaluée en mesurant la concentration de K^+ restant dans les cellules, après une période d'incubation de ces dernières avec le mélange d'antibiotique et de stérol. Plus grande sera la concentration de K^+ restant dans les cellules, plus grande aura été la protection du stérol contre l'action de l'antibiotique.

Il arrive aussi, que l'action de l'antibiotique polyénique soit telle, qu'il en résulte une fuite de l'hémoglobine, contenue dans les globules rouges, en plus des espèces de faibles poids moléculaires. De tels résultats sont obtenus avec l'étruscomycine. L'hémoglobine étant de couleur rouge, peut alors être utilisée comme indicateur de l'action de l'antibiotique sur les érythrocytes. Par une simple mesure de l'absorbance de l'hémoglobine restant dans les cellules, il devient possible d'évaluer la protection apportée par le stérol ayant été ajouté au milieu.

a) Protection des cellules Candida Albicans

La protection apportée aux cellules *Candida albicans*, par le cholestérol et l'ergostérol a été évaluée en mesurant la concentration de K^+ restant dans les cellules après incubation avec l'étruscomycine et les deux stérols. A une série de tubes contenant 0,5 ml de PBS, différentes concentrations de stérols dissouts dans du 2-propanol sont ajoutées. La même quantité d'antibiotique polyénique dissout dans du diméthyle sulfoxyde est ajoutée à chaque tube. Les quantités de solvants dans lesquels sont dissouts le stérol et l'antibiotique polyénique, n'affectent pas les cellules. Après une période d'incubation de 30 minutes à $37^{\circ}C$, alouée pour permettre au complexe antibiotique-stérol de se former, 2×10^7 cellules contenues dans 0,5 ml de PBS, sont ajoutées dans chaque tube. Les cellules sont alors incubées à $37^{\circ}C$ durant une période de 1 heure, entrecoupée de brèves agitations au vortex, ceci ayant pour but de maintenir le mélange homogène car les cellules ont tendance à se déposer au fond des tubes. Les tubes subissent une période de centrifugation de 10 minutes à $1500 \times g$; le surnageant est retiré et le culot de cellules est lavé avec 1 ml de PBS. Le culot des cellules est ensuite dispersé avec 1 ml d'une solution de lithium 15 mM, bouilli durant 5 minutes

et centrifugé à 3000 x g durant 10 minutes. La concentration de K^+ dans le surnageant est mesurée à l'aide d'un photomètre à flamme (modèle Corning 300).

b) Protection des érythrocytes

La protection apportée aux érythrocytes par le cholestérol et l'ergostérol a été évaluée en mesurant la concentration de K^+ restant dans les cellules après incubation avec l'antibiotique et les deux stérols. La mesure de K^+ a été utilisée pour l'amphotéricine B, mais pas dans le cas de l'étruscomycine, où c'est l'absorbance due à l'hémoglobine restant dans les cellules, qui fut employée pour évaluer la protection des stérols.

A une série de tubes contenant 0,5 ml de PBS, différentes quantités de stérols dissoutes dans du 2-propanol sont ajoutées. Une même quantité d'antibiotique polyénique dissout dans du diméthyle sulfoxyde est ajouté à chaque tube. Les quantités de solvants dans lesquelles sont dissouts les stérols et l'antibiotique n'affectent pas les cellules. Après une période d'incubation de 30 minutes, à 37°C, pour permettre au complexe de se former, 5×10^6 cellules contenues dans 0,5 ml de PBS sont ajoutées à chaque tube.

Dans le cas de l'étruscomycine, où l'hémoglobine sert d'indicateur de la protection apportée par les stéroïds aux cellules, un tube contrôle ne contenant que de l'étruscomycine et des érythrocytes dans du PBS est utilisé pour déterminer le moment où l'hémolyse est totale, celle-ci se produit en 10 à 15 minutes d'incubation. L'hémolyse est suivie en mesurant la transmittance à 670 nm sur un spectrophotomètre Coleman Junior.

Pour ce qui est des essais faits avec les autres antibiotiques polyéniques, une période d'incubation d'une heure, à 37°C, entrecoupée de brève agitation au vortex est alouée.

Les tubes subissent une période de centrifugation de 10 minutes à 2000 x g. Les surnageants sont enlevés et les culots sont lavés à deux fois avec 1 ml de PBS. Les cellules sont ensuite dispersées dans 1 ml d'une solution de lithium, de concentration 15 mM.

Le contenu en K^+ est ensuite déterminé avec un photomètre à flamme (modèle Corning 300). Pour les résultats obtenus avec l'étruscomycine, le contenu d'hémoglobine est déterminé en mesurant l'absorbance à 520 nm sur un spectrophotomètre Coleman Junior.

Les résultats des essais biologiques sont exprimés en pourcentage de contrôle. Celui-ci représente le rapport des concentrations de K^+ , ou de l'absorbance de l'hémoglobine obtenus pour chacun des tubes d'analyse, divisé par la concentration de K^+ , ou par l'absorbance d'un tube contrôle, multiplié par 100. Les tubes contrôles sont des tubes contenant les cellules sans antibiotique, ceci permet de déterminer le contenu de K^+ ou d'hémoglobine se trouvant initialement dans les cellules. D'autres tubes contrôles contenant du diméthyle sulfoxyde, du 2-propanol, du stérol et l'antibiotique servaient à vérifier l'effet que chacun d'eux pouvait avoir sur les cellules.

c) Préparation des liposomes de lécithine d'oeuf

Les liposomes de lécithine d'oeuf ont été préparés en ajoutant respectivement à trois contenants, dans lesquels se trouvait 0,4 ml de phospholipide, provenant de chez Sigma, 0 mg, 20 mg et 80 mg de cholestérol, à cela a été ajouté 0,5 ml de chloroforme. A l'aide d'un jet d'azote, le liquide dans lequel sont dissouts le cholestérol et les phospholipides, est évaporé pour laisser sur les parois du récipient un film mince uniforme. Un volume de 10 ml d'une solution de chlorure de sodium 0,155 M est

ajouté à chaque récipient, et chacun d'eux, baignant dans un bain de glace, est ensuite passé au sonicateur à une puissance de 50 watts, durant 4 séances de 15 minutes chacune. Un délai de 5 minutes était aloué entre chaque séance de sonication, dans le but d'éviter une surchauffe du sonicateur. Durant la période de sonication, 3 solutions contenant 80 mg d'albumine de sérum humain, dissout dans 4 ml de chlorure de sodium 0,155 M, sont préparées dans des tubes à centrifugation. Après la période de sonication, les trois suspensions sont transférées dans chacun des trois tubes et centrifugées pour une période de 30 minutes à 22000 x g. Le surnageant est délicatement transféré dans trois autres récipients, et le contenu en phospholipide et en cholestérol des surnageants est déterminé quantitativement. La concentration en phospholipides est déterminée par une méthode colorimétrique utilisant le molybdate d'ammonium (43), et la concentration en cholestérol est déterminée en utilisant les réactifs de Boehringer et Mannheim.

V

RESULTATS ET DISCUSSION

1) Spectre d'agrégats

L'utilisation de l'ordinateur a permis de tracer un spectre montrant le spectre d'absorption de l'amphotéricine B à l'état agrégé. Ceci a été effectué dans le but de montrer le peu d'influence, qu'ont les espèces agrégées sur l'intensité du pic à 408 nm.

Le spectre d'agrégats de l'amphotéricine B est obtenu par la soustraction des valeurs d'absorbance d'une solution d'amphotéricine B, dont le pourcentage d'alcool est peu élevé, c'est-à-dire 10 %, et dans laquelle prédomine l'état agrégé de l'amphotéricine B, des valeurs tirées du spectre d'une solution d'amphotéricine B se trouvant sous forme libre, c'est-à-dire dans 100 % d'alcool. Le but de ce calcul est d'élimi-

ner du spectre d'agrégat l'absorbance attribuable à l'espèce libre de l'amphotéricine B; comme le spectre d'agrégat, avant calcul, contient peu d'absorption due à l'espèce libre, les valeurs d'absorbance de l'espèce libre sont multipliées par un facteur pouvant varier d'une fraction quelconque entre 0 et 1. Le choix du facteur multiplicatif est guidé par le résultat des calculs, c'est-à-dire que le spectre résultant doit être régulier et composé uniquement de valeurs positives.

La figure 8 , montre le résultat d'un tel calcul, effectué par ordinateur, où le facteur multiplicatif est de 0,265. L'absorption est très faible aux longueurs d'ondes 408 nm, 384 nm et 366 nm, là où absorbe l'amphotéricine B, dont le spectre est représenté à la figure 9 . Sur le spectre d'agrégat apparaît un pic intense à 325 nm, alors que l'absorption est faible à cette énergie sur le spectre d'amphotéricine B libre (figures 8 et 9).

Bien que le spectre obtenu, de cette façon, soit tributaire du choix du facteur multiplicatif, il permet de visualiser assez clairement la région où absorbe principalement l'espèce agrégée des antibiotiques polyéniques, et indique la faible contribution de l'espèce agrégée à l'intensité du pic à 408 nm, là où absorbe l'espèce libre de l'amphotéricine B.

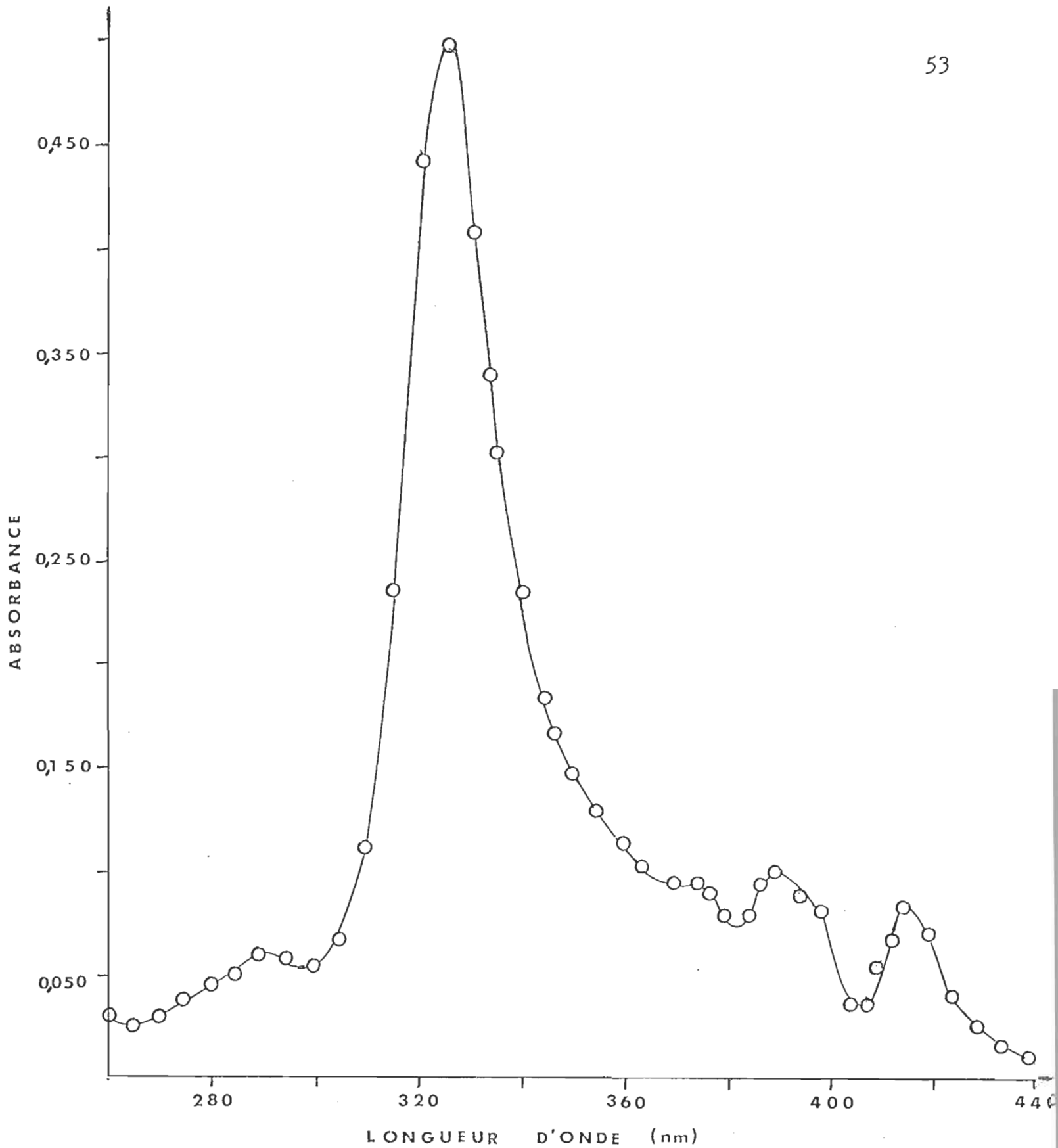


Figure 8. Spectre d'agrégat de l'amphotéricine B ($1 \times 10^{-5}M$) obtenu par ordinateur

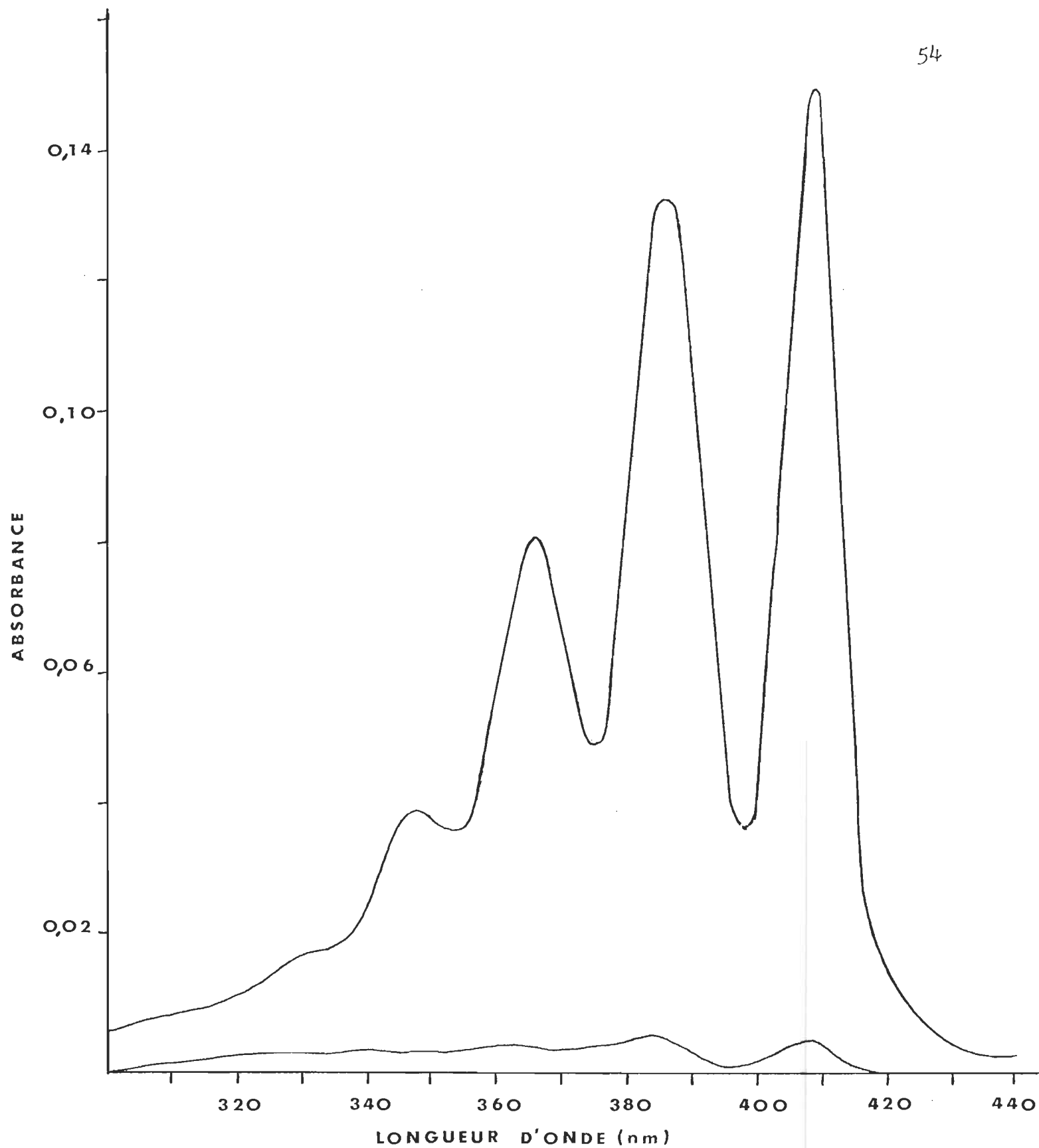


Figure 9. Spectre de l'amphotéricine B libre, dans le propanol $1 \times 10^{-6}M$.

2- Calcul de la concentration des complexes

Le calcul de la concentration des complexes antibiotique-stérol est effectué en mesurant le taux d'absorbance enregistré pour le premier pic du spectre différentiel, c'est-à-dire, pour le pic correspondant à la transition la moins énergétique du spectre. Le spectre obtenu par spectroscopie différentielle est, en fait une mesure des différences spectrales engendrées par l'addition d'un stérol à une solution d'antibiotique polyénique.

L'allure générale des spectres différentiels montre, dans la plupart des cas, pour le premier pic, une absorbance nulle ou bien négative. Une absorbance nulle sur le spectre différentiel, indique l'absence d'interaction entre le stérol et l'antibiotique, alors qu'une absorbance négative, au contraire, indique une disparition de l'antibiotique libre, celui-ci ayant réagit avec le stérol pour former un complexe.

L'intensité de cette bande négative du spectre différentiel, est reliée en bonne partie à la disparition d'antibiotique libre, mais aussi à la formation du complexe antibiotique-stérol. En effet, le complexe antibiotique-stérol absorbe aussi à cette longueur d'onde.

Dans le but de déterminer la quantité de complexe, qui se forme dans un milieu particulier, il faut connaître la valeur de son coefficient d'extinction molaire. Cette procédure est décrite dans la partie expérimentale.

Mathématiquement, l'intensité d'absorption du premier pic du spectre différentiel s'exprime:

$$A = -A_a + A_c \quad (1)$$

$$A = -\epsilon_a \cdot (A)_L + \epsilon_c \cdot (Cx) \quad (2)$$

où "A" identifie l'absorbance du pic étudié sur le spectre différentiel, " A_a " identifie l'absorbance de la forme libre de l'antibiotique, " A_c " identifie l'absorbance due au complexe, "(Cx)" identifie la concentration du complexe, " $(A)_L$ " identifie la concentration d'antibiotique libre disparu, " ϵ_a " identifie le coefficient d'extinction molaire de l'antibiotique et " ϵ_c " identifie le coefficient d'extinction molaire du complexe.

La concentration du complexe qui s'est formé étant égale à celle de l'antibiotique sous forme libre qui a disparu, l'intensité d'absorption différentielle "A" peut s'exprimer:

$$A = -\epsilon_a \cdot (Cx) + \epsilon_c \cdot (Cx) \quad (3)$$

$$A = (-\epsilon_a + \epsilon_c) \cdot (Cx) \quad (4)$$

$$(Cx) = A \cdot (-\epsilon_a + \epsilon_c)^{-1} \quad (5)$$

Le calcul de la concentration de complexe formée avec chacun des deux stérols est fait en utilisant l'équation (5). La comparaison des résultats obtenus avec l'un et l'autre stérol permet d'évaluer quantitativement pour lequel des deux stérols, un antibiotique polyènique a le plus d'affinité dans un milieu donné. L'affinité préférentielle d'un antibiotique polyènique pour un stérol ou pour l'autre peut être exprimée en terme de sélectivité. La sélectivité a été définie comme étant la différence des concentrations des complexes antibiotique-stérol:

$$S = (Cx)_{erg} - (Cx)_{chol} \quad (6)$$

Dans l'équation (6), "S" représente la sélectivité, " $(Cx)_{erg}$ " identifie la concentration du complexe antibiotique-ergostérol et " $(Cx)_{chol}$ " identifie la concentration du complexe antibiotique-cholestérol.

Une sélectivité positive indiquera que l'antibiotique forme plus de complexe avec l'ergostérol qu'avec le cholestérol, alors qu'une sélectivité négative indiquera l'inverse.

3- Filipine

La figure 10, montre une série de spectres différentiels de la filipine obtenus, alors que les mêmes concentrations d'antibiotique et de stéroïds se retrouvent dans différents milieux de méthanol. La concentration de méthanol varie de 10 % à 60 %, en volume.

Pour les solutions où les concentrations de méthanol dépassent 40 % en volume, il y a absence d'interaction entre la filipine et chacun des deux stéroïds. Lorsque la concentration de méthanol est de 30 %, le complexe filipine-cholestérol se forme bien en solution, alors que le complexe filipine-ergostérol se forme plus difficilement. La diminution de la concentration de méthanol à 20 % et à 10 % en volume permet une grande formation du complexe filipine-ergostérol, alors que la concentration du complexe filipine-cholestérol demeure approximativement identique à celle observée à 30 % de méthanol.

La figure 11, montre une série de spectres différentiels de la filipine obtenus, alors que les mêmes concentrations d'antibiotique et de stéroïds se retrouvent dans différents milieux de propanol, soit 1×10^{-5} M. La concentration de propanol varie entre 10 % et 25 % en volume.

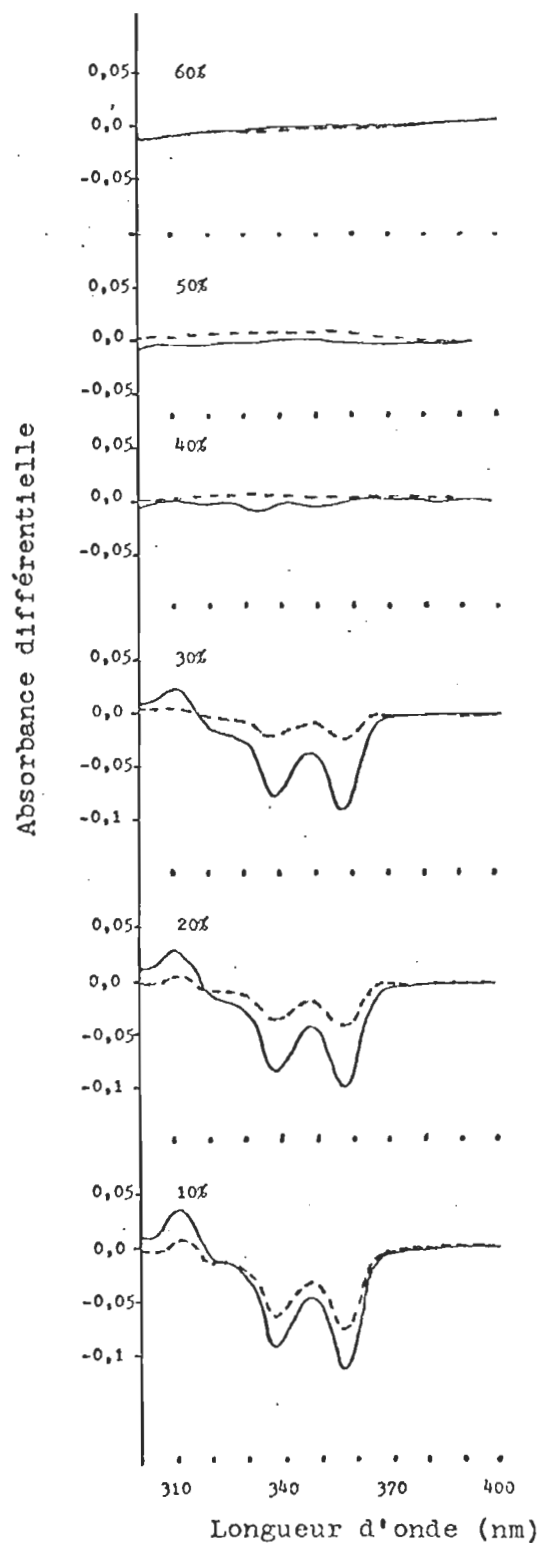


Fig. 10. Spectres d'absorption différentielle de la filipine en présence des stérols: — cholestérol; ---- ergostérol; dans le méthanol.

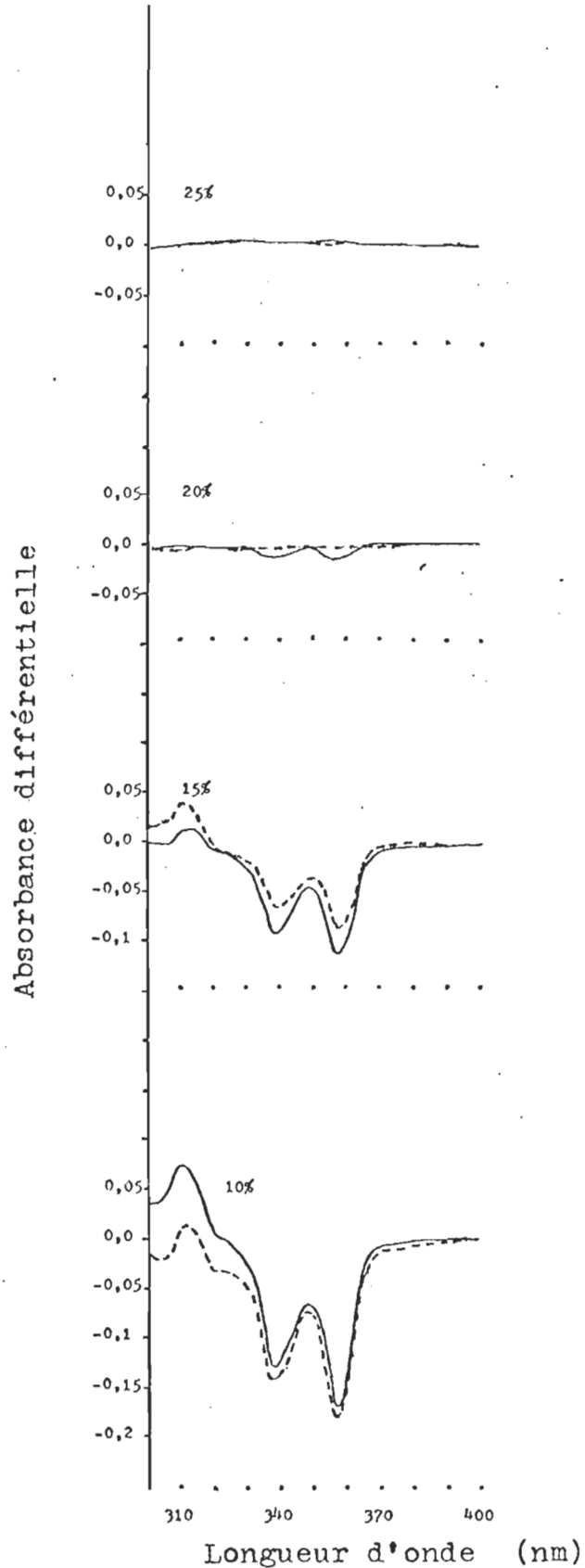


Fig. 11. Spectres d'absorption différentielle de la filipine en présence des stérols: — cholestérol; ---- ergostérol; dans le propanol

Pour les solutions où la concentration de propanol dépasse 20 %, les complexes filipine-cholestérol et filipine-ergostérol se forment peu dans le milieu. Lorsque la concentration de propanol est de 15 % en volume, le complexe filipine-ergostérol se forme en moins grande quantité que le complexe filipine-cholestérol. A 10 % de propanol l'interaction de la filipine avec les deux stérols est supérieure à ce qu'elle est à des concentrations supérieures de propanol. De plus, à 10 % de propanol, l'amplitude du spectre différentiel obtenu avec l'ergostérol dépasse celle du spectre différentiel obtenu avec le cholestérol.

La possibilité de visualiser l'intensité d'interaction entre la filipine et chacun des deux stérols, et cela à l'intérieur de milieux de compositions différentes, montre l'intérêt de la technique de spectroscopie différentielle. L'intensité d'interaction étant reliée à la quantité de complexe qui se forme dans le milieu, il en découle une diminution de la concentration de la filipine libre dans le milieu, ceci se reflétant sur l'amplitude du spectre différentiel. L'intensité d'interaction étant plus élevée entre la filipine et le cholestérol, qu'entre la filipine et l'ergostérol, l'amplitude des spectres différentiels de la filipine en présence du cho-

lestérol, est par conséquent supérieure à l'amplitude des spectres différentiels de la filipine en présence d'ergostérol.

La nature hydrophobe des deux complexes est mise en évidence par la différence de dissolution de ces derniers dans les deux alcools utilisés. A 25 % de propanol, aucun des complexes ne se forme en solution, alors que pour le méthanol, une même absence d'interaction entre la filipine et les deux stérols n'est pas observé à une concentration de méthanol inférieure à 50 % en volume.

La molécule de propanol est de structure plus hydrophobe, que la molécule de méthanol. Cette caractéristique est la base du raisonnement, qui conduit à la conclusion que les complexes filipine-stérols sont de nature hydrophobe.

Le spectre obtenu à 10 % de propanol, montre une amplitude plus élevée dans le cas où la filipine est en présence d'ergostérol, que lorsque la filipine est en présence de cholestérol. Ce comportement ressemble à celui observé avec l'é-truscomycine, qui a été étudié d'une manière plus quantitative que ne l'a été la filipine, et dont il sera question plus loin. Pour l'instant, il faut retenir que les conditions du milieu jouent un rôle important sur le comportement d'un an-

tibiotique polyènique en présence de stérols.

La méthode spectroscopique différentielle confirme donc, ce qui était déjà bien connu, que la filipine se lie plus fortement avec le cholestérol qu'avec l'ergostérol.

4- Nystatine

La figure 12 , montre une série de spectres différentiels de la nystatine, obtenus alors que les mêmes concentrations d'antibiotique et de stérols se retrouvent dans différents milieux de méthanol, soit 1×10^{-5} M. La concentration de méthanol varie entre 10 % et 30 % en volume.

Pour les solutions où la concentration de méthanol dépasse ou est de 30 % en volume, il y a absence d'interaction entre la nystatine et chacun des deux stérols. A 20 % de méthanol, le spectre obtenu, lorsque la nystatine est en présence de cholestérol, indique par sa faible amplitude, une faible concentration du complexe nystatine-cholestérol, alors que lorsque la nystatine est en présence d'ergostérol, l'amplitude du spectre différentiel indique une concentration du complexe nystatine-ergostérol supérieure à celle du complexe nystatine-cholestérol. A 10 % de méthanol, l'amplitude des spectres

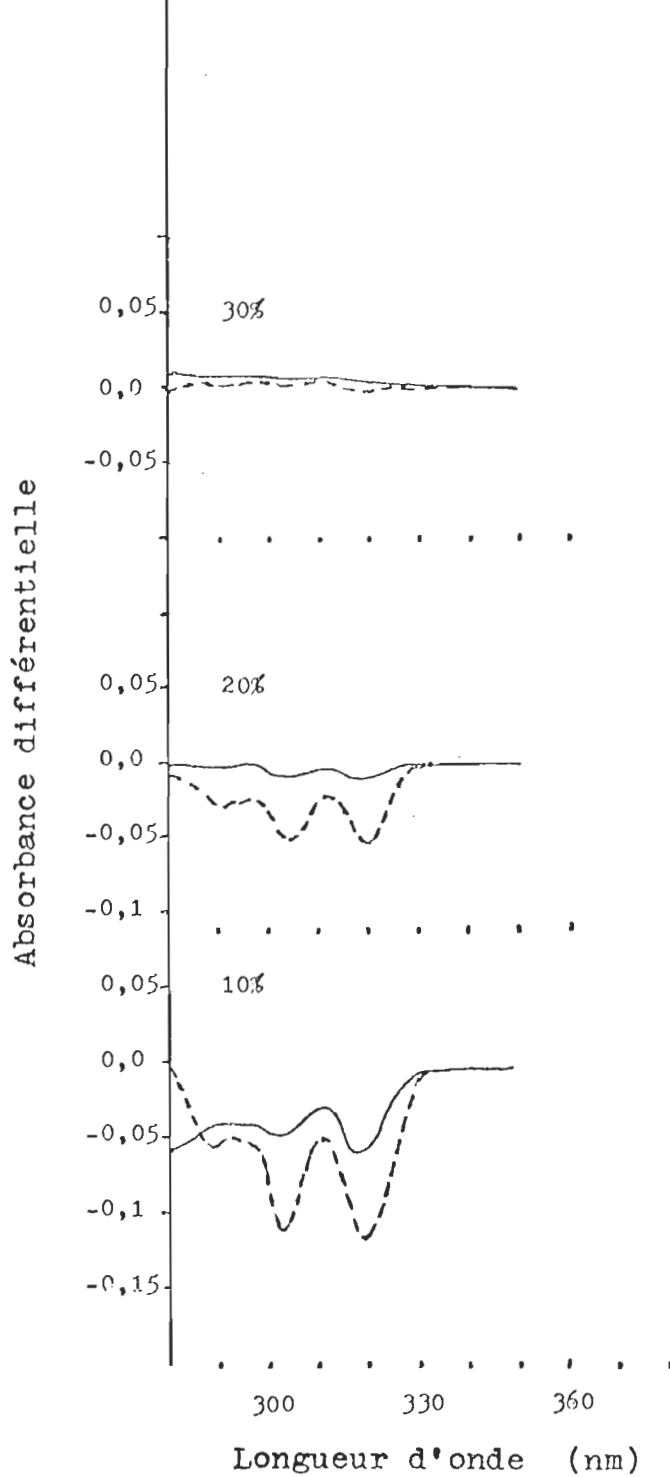


Fig. 12. Spectres d'absorption différentielle de la nystatine en présence des stérols: — cholestérol; ---- ergostérol; dans le méthanol.

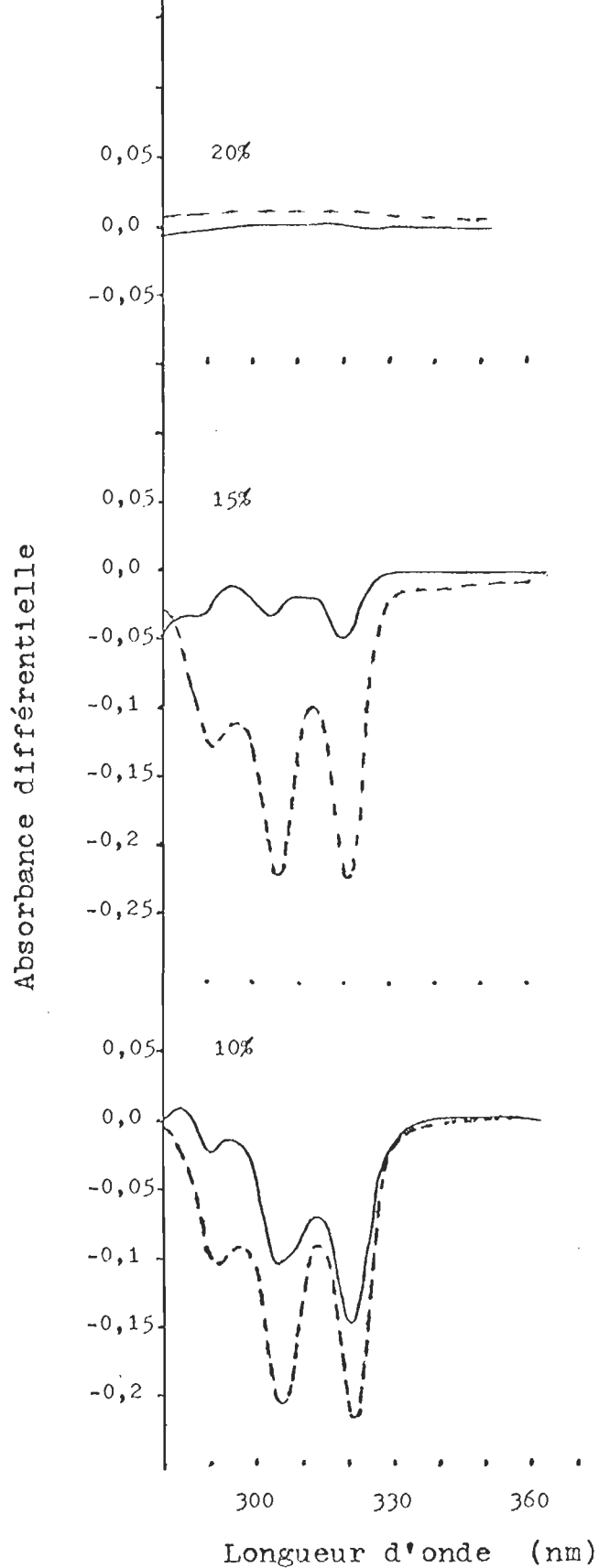


Fig. 13. Spectres d'absorption différentielle de la nystatine en présence des stérols: — cholestérol; ---- ergostérol; dans le propanol.

obtenus avec les deux stérols est supérieure à ce qu'elle est à des concentrations plus élevées de méthanol. La concentration du complexe nystatine-ergostérol dépasse cependant, celle du complexe nystatine-cholestérol.

La figure 13, montre une série de spectres différentiels de la nystatine, obtenus alors que les mêmes concentrations d'antibiotique et de stérols se retrouvent dans différents milieux de propanol, soit 1×10^{-5} M. La concentration de propanol varie entre 10 % et 20 % en volume.

Pour les solutions où la concentration de propanol dépasse ou est de 20 % en volume, il y a absence d'interaction entre la nystatine et les deux stérols. A 15 % de propanol, le spectre obtenu lorsque la nystatine est en présence de cholestérol montre une amplitude inférieure à celle du spectre obtenu lorsque la nystatine est en présence d'ergostérol, indiquant, que la concentration du complexe nystatine-ergostérol dépasse la concentration du complexe nystatine-cholestérol. A 10 % de propanol, la concentration du complexe nystatine-cholestérol est supérieure à ce qu'elle était à 15 % de propanol, contrairement à la concentration du complexe nystatine-ergostérol, qui demeure à peu près la même à 10 % comme à 15 %

de propanol.

Ces résultats permettent de visualiser l'intensité d'interaction entre la nystatine et chacun des deux stérols, à l'intérieur de milieux de compositions différentes. Ici comme pour la filipine, l'intensité d'interaction entre la nystatine et les deux stérols, est reliée à la quantité de complexe qui se forme dans le milieu, il en résulte une diminution de la concentration de nystatine libre dans le milieu, ceci se reflétant sur l'amplitude des spectres différentiels. L'intensité d'interaction étant plus élevée entre la nystatine et l'ergostérol, qu'entre la nystatine et le cholestérol, l'amplitude des spectres différentiels de la nystatine en présence de l'ergostérol, est par conséquent supérieure à l'amplitude des spectres différentiels de la nystatine en présence de cholestérol.

Le propanol dissout mieux les complexes formés par la nystatine et les deux stérols, que ne le fait le méthanol. En effet, à 20 % de propanol, aucune interaction entre la nystatine et les deux stérols n'est mesurée, alors qu'à ce même taux de méthanol, il existe une interaction visible sur les spectres différentiels. La nature hydrophobe de l'interac-

tion entre la nystatine et les deux stérols est confirmée par ces observations.

La méthode spectroscopique différentielle confirme l'affinité préférentielle de la nystatine pour l'ergostérol comme elle a confirmé l'affinité préférentielle de la filipine pour le cholestérol. Cette méthode sera maintenant appliquée à un niveau plus quantitatif pour l'étude de l'amphotéricine B et de l'étruscomycine.

5- Amphotéricine B

a) Résultats biologiques

Du point de vue de l'activité biologique, il est déjà connu que l'amphotéricine B a plus d'affinité pour l'ergostérol que pour le cholestérol (38). Il ne s'est donc pas avéré utile de répéter l'expérimentation biologique, identifiant lequel, du cholestérol ou de l'ergostérol, possédait le plus d'affinité pour l'amphotéricine B. Toutefois, dans le but de vérifier si les phospholipides procurent une protection biologique contre l'action de l'amphotéricine B, quelques essais ont été effectués à l'aide de liposomes de lécithine d'oeuf.

La figure 14, montre les résultats de protection biologique apportée aux érythrocytes par le cholestérol seul et par deux types de liposomes, contenant respectivement 34 % et 63 % en mole de cholestérol, contre l'action de l'amphotéricine B. Ces résultats sont présentés en fonction du rapport amphotéricine B:cholestérol.

Chaque espèce apporte une protection aux érythrocytes. A un rapport molaire amphotéricine B:cholestérol de 0,22, la meilleure protection est obtenue avec les liposomes renfermant 63 % en mole de cholestérol, où 99 % du K^+ cellulaire demeure à l'intérieur des cellules. A ce même rapport amphotéricine B:cholestérol, le cholestérol seul procure la plus faible protection, où seulement 71 % du K^+ est conservé par les cellules, alors que les liposomes renfermant 34 % en mole de cholestérol, offrent une protection intermédiaire entre celle des liposomes contenant 63 % en mole de cholestérol et celle procurée par le cholestérol seul, soit une protection de 89 %. A des rapports molaires amphotéricine B:cholestérol supérieurs à 2,0, le niveau relatif de protection donné par chacune des espèces, conserve un ordre identique à celui observé au rapport molaire 0,22, où moins de 40 % du K^+ cellulaire est conservé à l'inté-

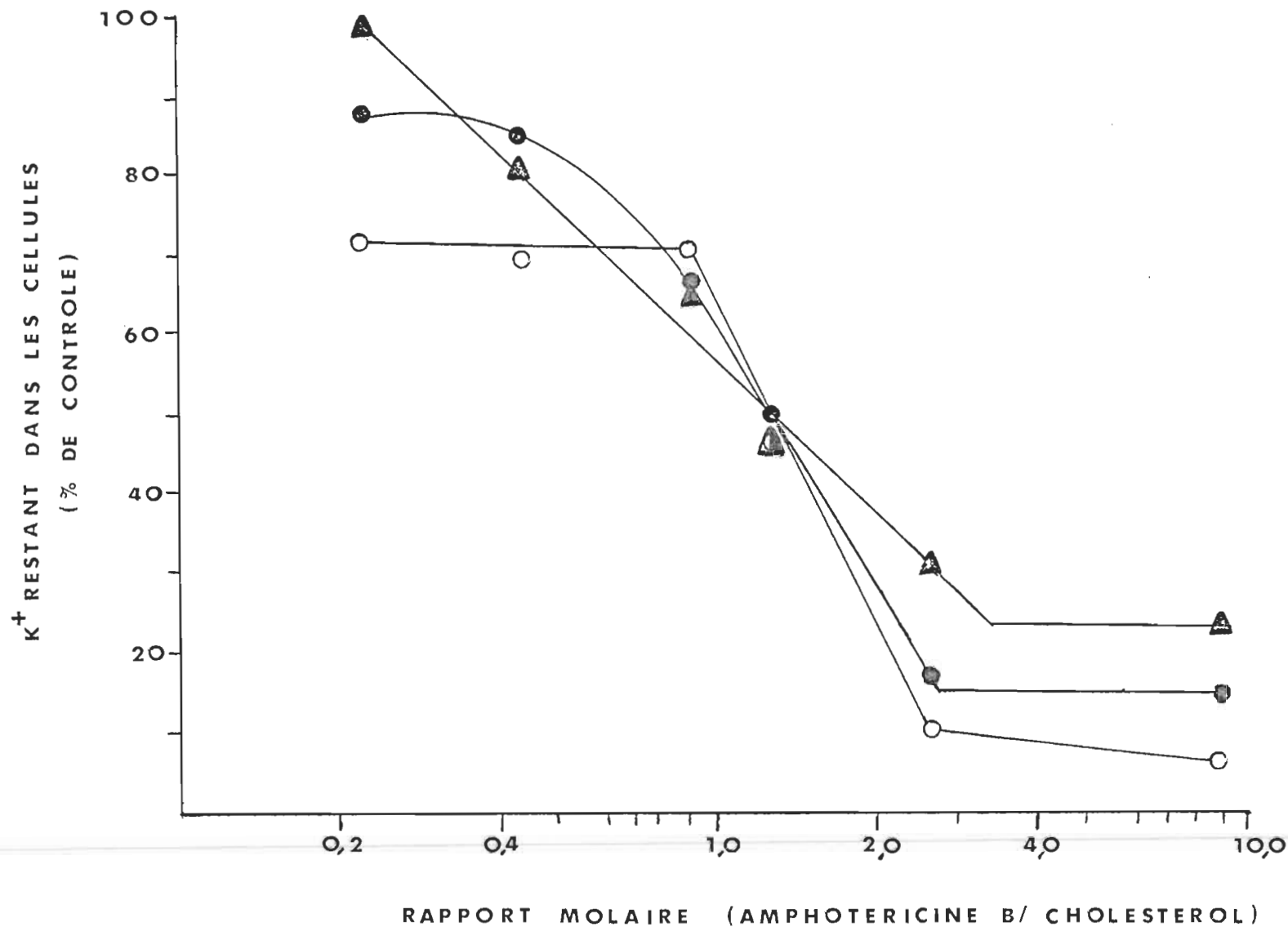


Figure 14. Protection biologique des érythrocytes humains par le cholestérol (O) et par des liposomes de lécithine d'oeuf contenant 34 % (●) et 63 % (▲) en mole de cholestérol, contre l'action de l'amphotéricine B dont la concentration est $1,35 \times 10^{-6}$ M.

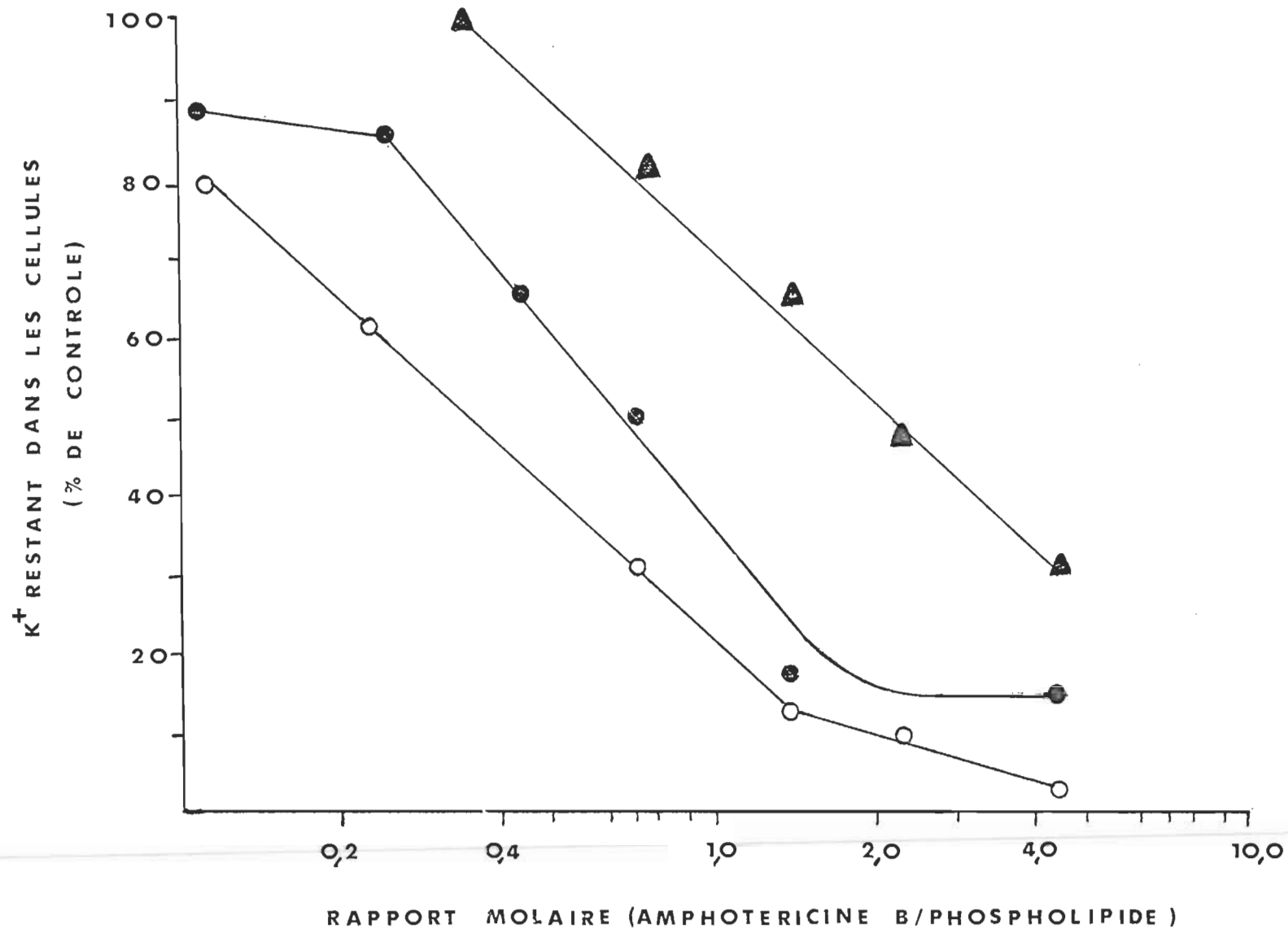


Figure 15. Protection biologique des érythrocytes humains par différents types de liposomes contenant 0 % (O), 34 % (●) et 63 % (▲) en mole de cholestérol, contre l'action de l'amphotéricine B dont la concentration est $1,35 \times 10^{-6}$ M.

rieur des cellules. Pour les rapports molaires amphotéricine B:cholestérol intermédiaires entre 0,44 et 1,5, le niveau de protection apportée aux érythrocytes par chaque espèce diminue graduellement, alors qu'augmente le rapport molaire amphotéricine B:cholestérol. A l'intérieur de ces deux rapports, les taux de protection procurés par les différentes espèces demeurent relativement près les uns des autres.

La figure 15, montre les résultats de protection biologique apportée aux érythrocytes, par trois types de liposomes, contenant respectivement 0 %, 34 % et 63 % en mole de cholestérol, contre l'action de l'amphotéricine B. Ces résultats sont, en partie, les mêmes résultats que ceux présentés à la figure 11, mais ils sont présentés en fonction du rapport amphotéricine B:phospholipide. Ceci a pour but de visualiser la protection procurée par les liposomes en fonction de leur contenu en phospholipides.

Au rapport molaire amphotéricine B:phospholipide 0,12, les érythrocytes obtiennent une protection totale de la part des liposomes contenant 63 % en mole de cholestérol, 89 % de protection de la part des liposomes contenant 34 % en mole de cholestérol, et 79 % de protection de la part des liposomes

ne contenant pas de cholestérol. Le niveau de protection de chaque type de liposome diminue graduellement, alors qu'augmente le rapport molaire amphotéricine B:phospholipide. Au rapport molaire amphotéricine B:phospholipide 4,6 les liposomes contenant 63 % en mole de cholestérol, procurent 30 % de protection, alors que les liposomes contenant 34 % en mole de cholestérol, procurent une protection inférieure à 20 %, et que les liposomes ne contenant pas de cholestérol, procurent une protection inférieure à 5 %.

La figure 16, montre les résultats de protection biologique apportée aux cellules *Candida albicans* par deux types de liposomes, contenant respectivement 34 % et 63 % en mole de cholestérol, contre l'action de l'amphotéricine B. Ces résultats sont présentés en fonction du rapport amphotéricine B:cholestérol.

Les cellules *Candida albicans* obtiennent peu de protection de la part des deux types de liposomes. Au rapport molaire amphotéricine B:cholestérol 0,01 les deux types de liposomes procurent près de 30 % de protection, ceci est le maximum de protection enregistrée, pour les différents rapports amphotéricine B:cholestérol. La meilleure protection

est obtenue avec les liposomes contenant 63 % en mole de cholestérol, alors que les liposomes contenant 34 % en mole de cholestérol, procurent à peu près pas de protection.

La figure 17, montre les résultats de protection biologique apportée aux cellules *Candida albicans* par trois types de liposomes, contenant respectivement 0 %, 34 % et 63 % en mole de cholestérol. Ces résultats sont présentés en fonction du rapport amphotéricine:phospholipide.

Les cellules *Candida albicans* obtiennent la meilleure protection, de la part des liposomes contenant 63 % en mole de cholestérol, alors que les liposomes contenant 34 % en mole de cholestérol et ceux qui ne contiennent pas de cholestérol, leur procurent une protection à peu près nulle pour presque tous les rapports amphotéricine B : phospholipide étudiés, à l'exception des rapports inférieurs à 0,015, où les liposomes contenant 34 % en mole de cholestérol, procurent une protection supérieure à celle des phospholipides seuls.

Les résultats expérimentaux qu'illustre la figure 11, montrent que les phospholipides augmentent la protection effectuée par le cholestérol contre l'action de l'amphotéricine B sur les érythrocytes, puisque le niveau de protection de cha-

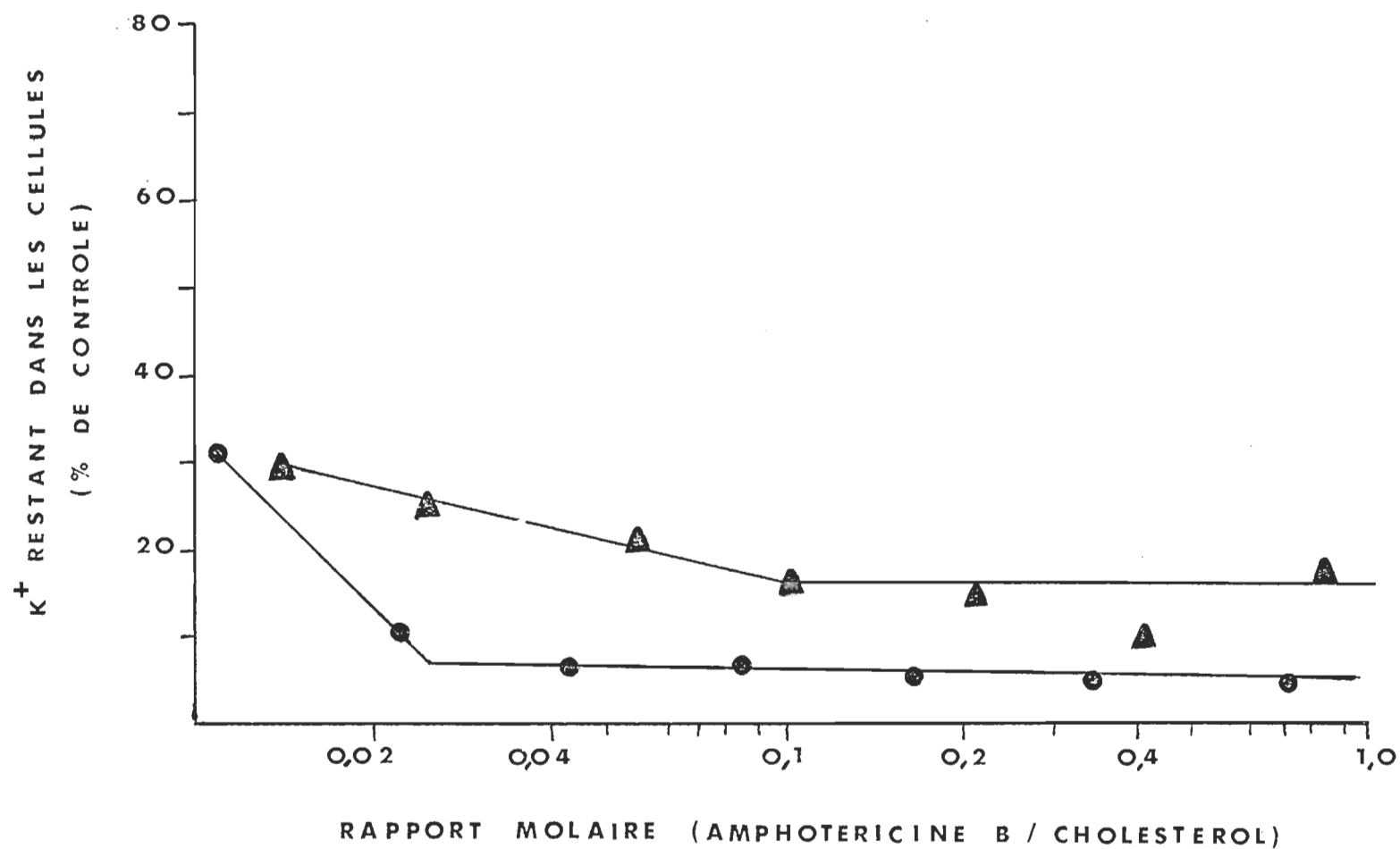


Figure 16. Protection biologique des fungus *Candida albicans* par deux types de liposomes contenant 34 % (●) et 63 % (▲) en mole de cholestérol, contre l'action de l'amphotéricine B dont la concentration est $1,0 \times 10^{-6}$ M.

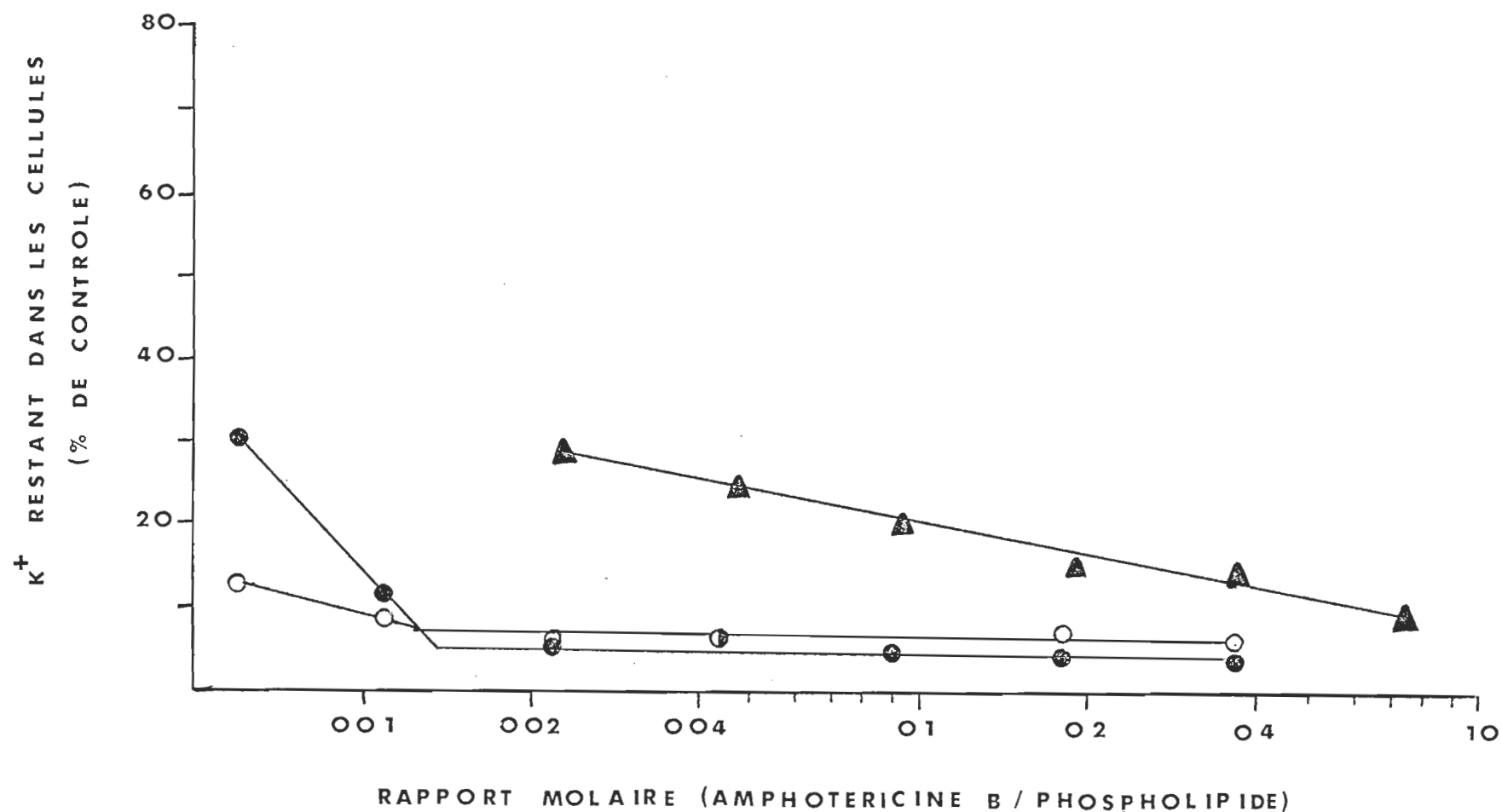


Figure 17. Protection biologique des fungus *Candida albicans* par trois types de liposomes contenant 0 % (O), 34 % (●) et 63 % (▲) en mole de cholestérol, contre l'action de l'amphotéricine B dont la concentration est $1,0 \times 10^{-6}$ M.

cun des types de liposome contenant du cholestérol, lorsqu'il n'est pas à peu près égal à celui du cholestérol, lui est supérieur, et cela pour tous les rapports amphotéricine B:cholestérol étudiés.

La figure 15 , illustre bien que les phospholipides seuls sont en mesure d'inhiber, dans une certaine mesure, l'action de l'amphotéricine B contre les érythrocytes, et que cette inhibition augmente lorsque du cholestérol est ajouté aux liposomes de phospholipides.

Ces résultats confirment l'idée, que les antibiotiques polyéniques ne sont pas seulement sensibles aux stérols, mais qu'ils le sont aussi aux phospholipides (27, 41)

La figure 16 , illustre que les deux types de liposomes contenant du cholestérol, inhibent peu l'action de l'amphotéricine B sur les cellules *Candida albicans*. La protection maximale ne dépasse pas 30 % malgré la présence d'environ 90 molécules de cholestérol pour 1 molécule d'amphotéricine B, ce qui diffère beaucoup des résultats obtenus avec les érythrocytes, où une protection de 99 % est obtenue, lorsque seulement 5 molécules de cholestérol sont présentes pour 1 molécule d'am-

photéricine B.

La figure 17 , illustre les mêmes résultats que la figure 16 , où les différents types de liposomes procurent peu de protection aux cellules *Candida albicans*. La plus grande protection est donnée par les liposomes qui contiennent la plus grande quantité de cholestérol, soit ceux contenant 63 % en mole de cholestérol.

Ces résultats biologiques obtenus avec les érythrocytes et les cellules *Candida albicans*, quoique différents, permettent de confirmer des points déjà connus et de mettre en évidence la complexité de l'interaction de l'amphotéricine B avec la membrane des cellules.

La différence des résultats obtenus avec les deux types de cellules, trouve une explication lorsque sont considérés les points suivants: que le stérol membranaire principal contenu dans la membrane de chaque type de cellule est différent, et que l'affinité préférentielle de l'amphotéricine B va pour l'ergostérol. En effet, il est plus aisé de protéger contre l'action de l'amphotéricine B, qui se lie préférentiellement avec l'ergostérol, les érythrocytes qui contiennent

du cholestérol dans leur membrane, que de protéger, en utilisant des liposomes qui contiennent du cholestérol, les cellules *Candida albicans*, qui elles, contiennent de l'ergostérol dans leur membrane cellulaire.

En présence des érythrocytes, l'amphotéricine B a la possibilité de se lier au cholestérol contenu dans la membrane cellulaire des érythrocytes ou de se lier au cholestérol se trouvant dans le milieu, à l'intérieur ou non de liposomes. En présence des cellules *Candida albicans*, l'amphotéricine B a toujours la possibilité de se lier au stérol contenu dans la membrane cellulaire de *Candida albicans* ou de se lier au cholestérol se trouvant dans le milieu, à l'intérieur de liposomes, cependant la liaison avec l'ergostérol de la membrane sera favorisée, car l'amphotéricine B possède plus d'affinité pour l'ergostérol que pour le cholestérol présent dans la solution.

De l'ensemble de ces résultats biologiques, il apparaît que l'amphotéricine B se lie assez fortement avec l'ergostérol, moins fortement avec le cholestérol et encore moins fortement avec les phospholipides. La figure 15, illustre clairement

que les liposomes ne contenant pas de cholestérol, procurent une protection aux érythrocytes.

La visualisation d'une interaction amphotéricine B-phospholipide, permet de constater que l'interaction des antibiotiques polyéniques avec les membranes cellulaires, ne s'explique pas uniquement par une relation simple antibiotique-stérol, mais qu'elle est de nature plus complexe.

b) Résultats spectroscopiques

La figure 18, montre une série de spectres différentiels de l'amphotéricine B obtenus, alors que les mêmes concentrations d'antibiotique et de stérols se retrouvent dans différents milieux de méthanol, soit 1×10^{-5} M. La concentration de méthanol varie entre 10 % et 60 % en volume.

L'intensité d'absorbance différentielle à 408 nm, pour les solutions où l'amphotéricine B est en présence de l'ergostérol, est supérieure à celle des solutions où l'antibiotique polyénique est en présence du cholestérol, et cela pour l'ensemble des spectres illustrés sur cette figure. L'intensité des pics apparaissant à 408 nm, augmente graduellement entre

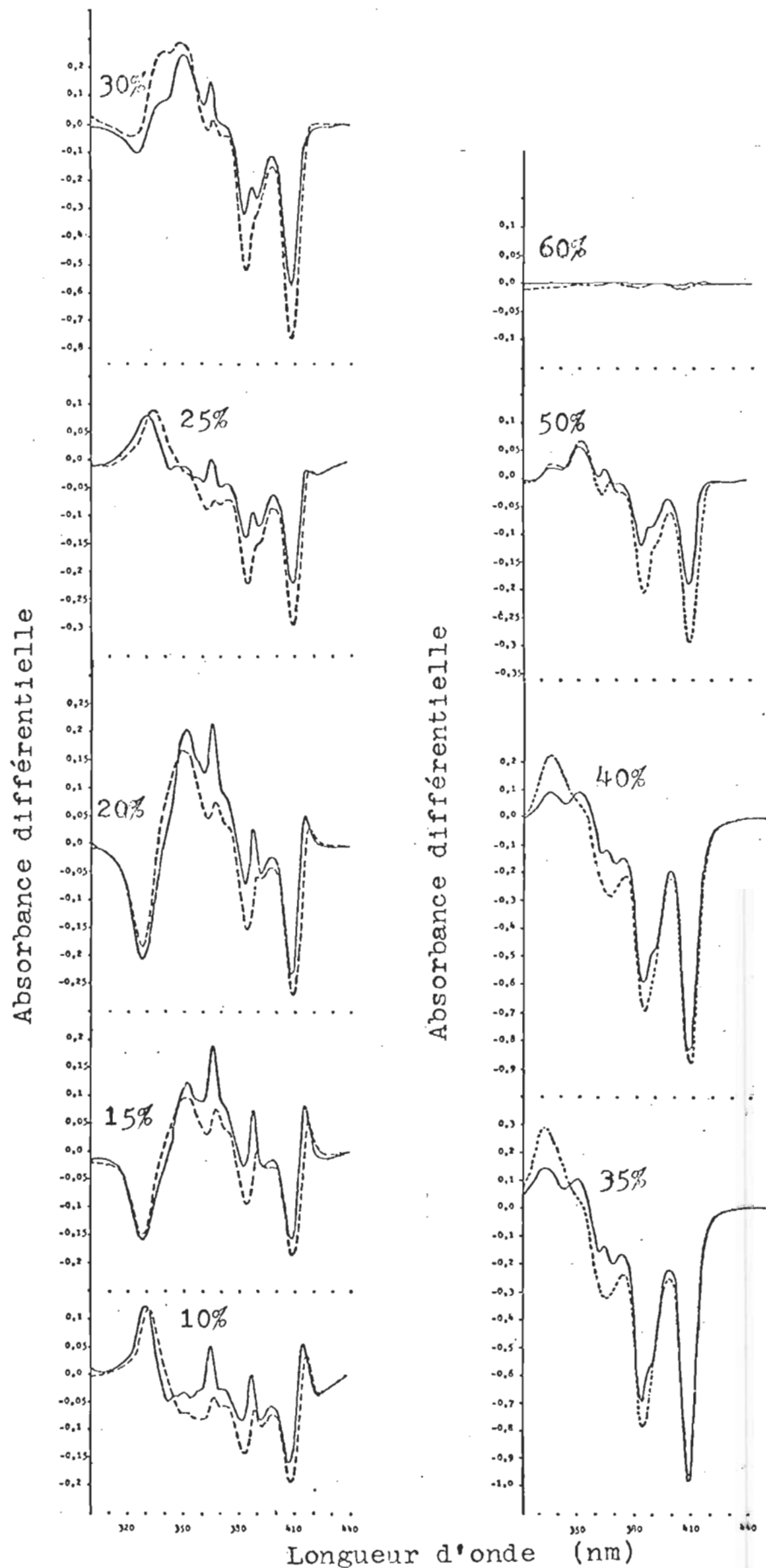


Fig. 18: Spectres d'absorption différentielle de l'amphotéricine B en présence des stérols: — cholestérol; --- ergostérol dans le méthanol.

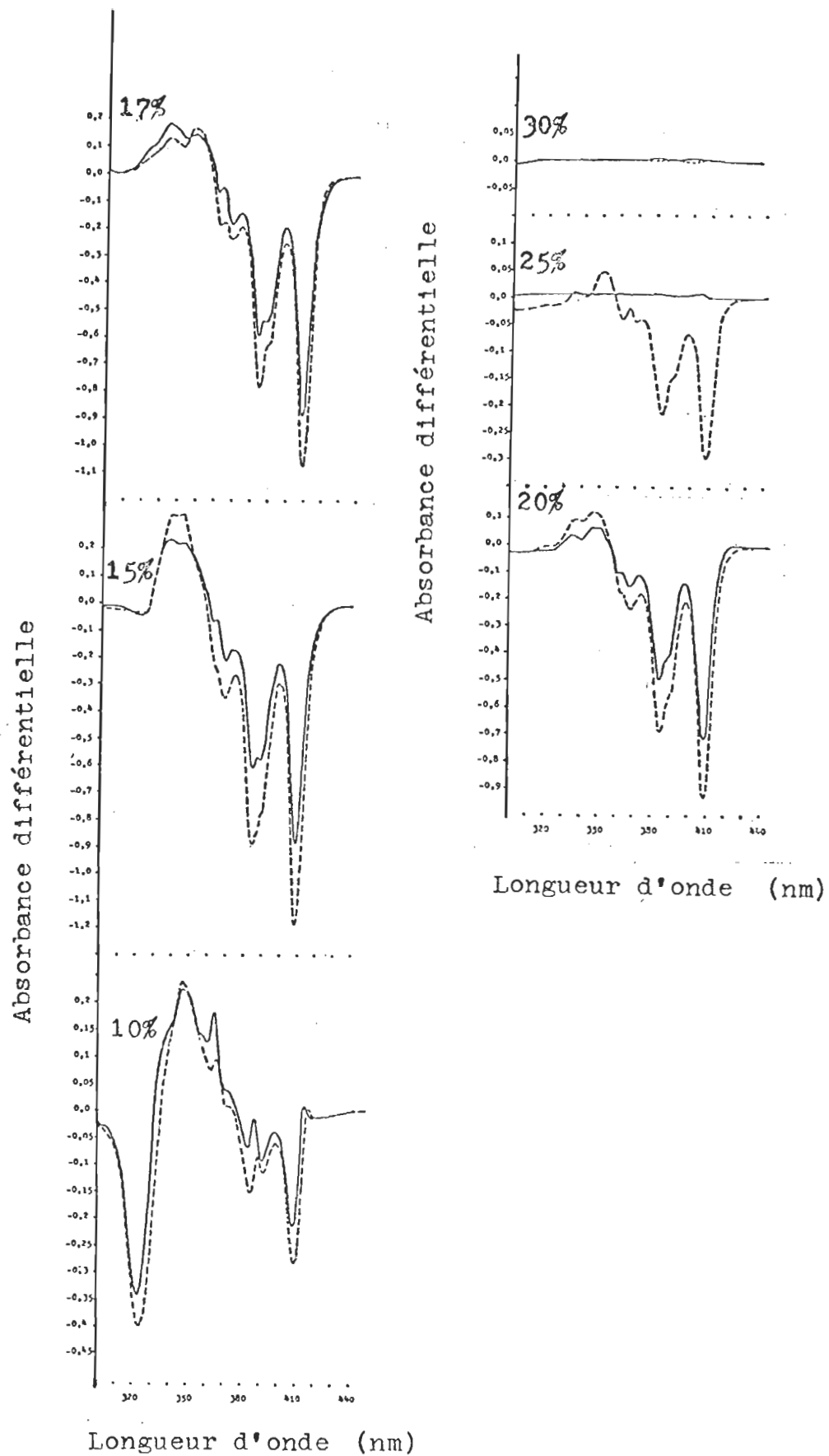


Fig. 19: Spectres d'absorption différentielle de l'amphotéricine B en présence des stérols:— cholestérol; ---- ergostérol; dans le propanol.

10 % et 40 % en volume de méthanol, alors qu'elle diminue entre 40 % et 60 % en volume de méthanol

La figure 19, montre une série de spectres différentiels de l'amphotéricine B obtenus, alors que les mêmes concentrations d'antibiotique et de stérols se retrouvent dans différents milieux de propanol, soit 1×10^{-5} M. La concentration de propanol varie entre 10 % et 30 % en volume .

L'intensité d'absorbance différentielle à 408 nm, pour les solutions où l'amphotéricine B est en présence de l'ergostérol, est supérieure à celle des solutions où l'antibiotique polyénique est en présence du cholestérol, et cela pour l'ensemble des spectres illustrés sur cette figure. L'intensité d'absorbance différentielle à 408 nm, augmente graduellement entre 10 % et 17 % en volume de propanol, et diminue pour disparaître totalement entre 20 % et 30 % en volume de propanol.

La figure 20, montre le spectre différentiel de l'amphotéricine B obtenu, lorsque du triton X-100 est ajouté à une solution où les mêmes concentrations d'antibiotique et de stérols se retrouvent dans 10 % en volume de méthanol.

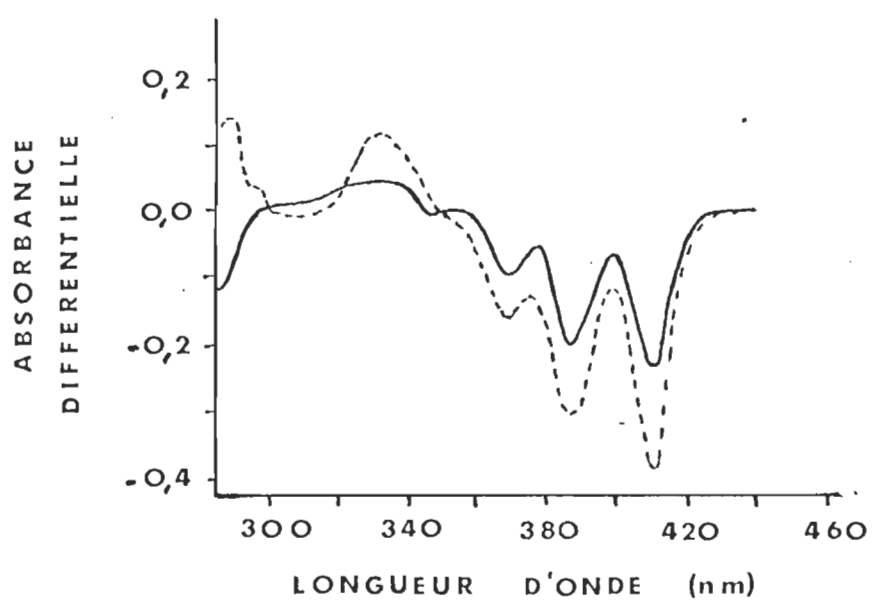


Figure 20. Spectre d'absorption différentielle de l'amphotéricine B en présence des stérols: — cholestérol, ---- ergostérol, et du Triton X-100 (0,2 %), dans 10 % en volume de méthanol.

Solvant	%V	A _{erg}	A _{chol}	(Cx) _{erg} (Mole.l ⁻¹) (x 10 ⁶)	(Cx) _{chol} (Mole.l ⁻¹) (x 10 ⁶)	S (Mole.l ⁻¹) (x 10 ⁶)
Méthanol	10	-0,198	-0,160	1,57	1,32	0,25
	15	-0,188	-0,155	1,49	1,28	0,21
	20	-0,265	-0,232	2,10	1,92	0,18
	25	-0,299	-0,221	2,37	1,83	0,54
	30	-0,880	-0,678	6,98	5,60	1,38
	35	-0,980	-0,970	7,78	8,02	-0,24
	40	-0,880	-0,840	6,98	6,94	0,04
	50	-0,220	-0,150	1,74	1,24	0,50
	60	-0,010	0,00	0,08	0,00	0,08
	70	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Méthanol + 0,2% Triton X-100	10	-0,390	-0,235	3,09	1,94	1,15
Propanol	10	-0,280	-0,210	2,22	1,73	0,49
	15	-0,665	-0,529	5,28	4,37	0,91
	17	-1,065	-0,887	8,45	7,33	1,12
	20	-0,928	-0,720	7,36	5,95	1,41
	25	-0,360	0,00	2,85	0,00	2,85
	30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tableau 1: Effet du cholestérol et de l'ergostérol sur le spectre d'absorption de l'amphotéricine

%V: Concentration en volume d'alcool;

A_{erg}: Intensité du pic à 408 nm pour les solutions d'amphotéricine B + ergostérol;

A_{chol}: Intensité du pic à 408 nm pour les solutions d'amphotéricine B + cholestérol;

(Cx)_{erg}: Concentration du complexe amphotéricine B-ergostérol;

(Cx)_{chol}: Concentration du complexe amphotéricine B-cholestérol;

S = (Cx)_{erg} - (Cx)_{chol};

La présence de triton X-100 à une concentration de 0,2 % en volume, provoque une augmentation de l'intensité des pics différentiels à 408 nm, pour les deux complexes amphotéricine B-cholestérol et amphotéricine B-ergostérol, en plus de transformer l'allure générale du spectre obtenu à 10 % de méthanol.

Le tableau 1 , présente les concentrations des complexes amphotéricine B-cholestérol et amphotéricine B-ergostérol, et les valeurs calculées de sélectivité de l'amphotéricine B envers les deux stérols, en fonction de la concentration des deux alcools en solution. Les concentrations des complexes ont été calculées à 408 nm, à partir des spectres différentiels et des coefficients d'extinction molaire, qui sont $1,4 \times 10^5$ $\text{l}\cdot\text{mole}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour l'amphotéricine B, $1,4 \times 10^4$ $\text{l}\cdot\text{mole}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour le complexe amphotéricine B-ergostérol et $1,9 \times 10^4$ $\text{l}\cdot\text{mole}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour le complexe amphotéricine B-cholestérol. La figure 21 , illustre les courbes à partir desquelles ont été déterminés les coefficients d'extinction molaire pour les complexes de l'amphotéricine B lié avec les deux stérols. Le coefficient d'extinction molaire de l'amphotéricine B ayant été obtenu à partir de la courbe présentée à la figure 6 .

Les spectres illustrés sur les figures 18 et 19, montrent une augmentation des concentrations des complexes for-

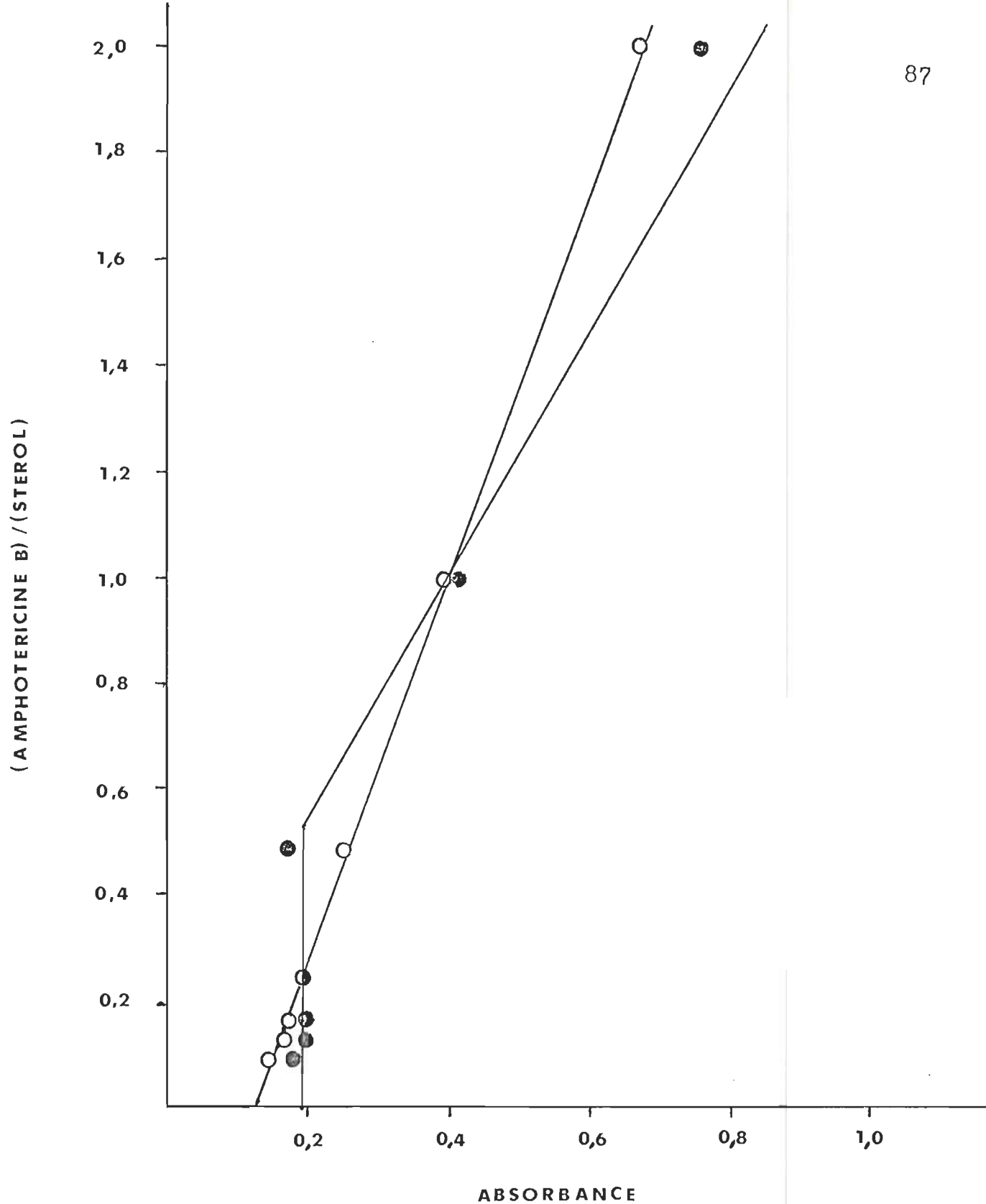


Figure 21. Détermination, dans 17 % en volume de propanol, du coefficient d'extinction molaire du complexe amphotéricine B-cholestérol (●) et du complexe amphotéricine B-ergostérol (O) à 408 nm.

més par l'amphotéricine B et les deux stérols, suivie d'une diminution des concentrations de ces mêmes complexes, alors qu'augmentent les concentrations des alcools dans les solutions. Ce phénomène s'explique par une meilleure solubilisation des agrégats, alors qu'augmente la concentration des alcools dans le milieu, ce qui favorise la formation des complexes amphotéricine B-stérols, suivie d'une solubilisation des complexes amphotéricine B-stérols, alors qu'augmente de plus en plus la concentration des alcools dans le milieu.

Le triton X-100 est un détergent, qui brise les agrégats, lorsqu'il est ajouté à un milieu qui en contient. Comme le montrent les figures 18 et 20 , et le tableau 1 , la présence de 0,2 % de triton X-100 dans une solution d'amphotéricine B contenant 10 % en volume de méthanol, amène une modification nette des spectres différentiels, ainsi que de la quantité de complexe qui se forme en solution, et cela pour les deux stérols étudiés. En brisant les agrégats, le triton X-100 permet l'interaction entre la forme libre de l'amphotéricine B et le stérol présent dans la solution, ce qui conduit à une augmentation de la quantité de complexe dans la solution. Le méthanol et le propanol produisent un effet similaire à

celui produit par le triton X-100, mais à une plus grande concentration que ce dernier.

Les valeurs inscrites dans le tableau 1 , permettent de visualiser quantitativement la formation des complexes amphotéricine B-cholestérol et amphotéricine B-ergostérol dans les différents milieux étudiés. Il existe un domaine de compositions de solvants, où la quantité d'amphotéricine B, sous forme libre est suffisante pour permettre l'association avec les stérols, mais où la quantité d'alcool n'est pas suffisante pour briser les complexes amphotéricine B-stérols. Ce domaine est plus étendu pour le méthanol que pour le propanol.

La sélectivité qui est indiquée à la droite du tableau 1 , permet de voir si les conditions du milieu étudié, favorisent plus la formation du complexe amphotéricine B-cholestérol ou si elles favorisent plus la formation du complexe amphotéricine B-ergostérol. Les valeurs de sélectivité sont généralement plus élevées dans le propanol que dans le méthanol, ce qui indique que le propanol produit des conditions plus sélectives que ne le fait le méthanol, en défavorisant la formation du complexe amphotéricine B-stérol, qui possède la plus faible force de cohésion. Dans le cas de l'amphotéricine B, il est

clair que c'est l'association avec le cholestérol qui est la plus faible, et l'association avec l'ergostérol qui est la plus forte. Cette observation confirme les résultats déjà connus (38), qui attribuent à l'amphotéricine B, une plus grande affinité pour l'ergostérol que pour le cholestérol.

La nature hydrophobe des deux complexes amphotéricine B-stérols, est mise en évidence par la différence de dissolution de ces derniers dans les deux alcools utilisés. Le propanol, qui est de structure plus hydrophobe que le méthanol, dissout mieux les agrégats, et dissout aussi mieux les complexes amphotéricine B-stérols, que ne le fait le méthanol. L'étude des spectres illustrés aux figures 15 et 16 et du tableau 1, montre qu'à un pourcentage de propanol de 30 %, aucun des complexes ne se forment en solution, alors que pour le même pourcentage de méthanol, la concentration du complexe amphotéricine B-cholestérol est de $5,60 \times 10^{-6}$ M et que la concentration du complexe amphotéricine B-ergostérol est de $6,98 \times 10^{-6}$ M.

L'interprétation de ces résultats s'appuie sur une égale accessibilité des stérols vis-à-vis l'antibiotique, en d'autres termes, une différence de la solubilité des deux stérols dans les différents milieux étudiés, ne doit pas intervenir

dans l'explication de ces phénomènes. La solubilité de l'ergostérol est légèrement inférieure à celle du cholestérol dans l'eau et dans l'alcool (42). Ceci confirme la validité du raisonnement, c'est-à-dire que ce n'est pas une plus grande solubilisation de l'ergostérol, que du cholestérol, dans les différents milieux, qui est responsable des résultats obtenus, mais bien une différence d'interaction entre l'antibiotique et les deux stérols.

6- Etruscomycine

a) Résultats biologiques

La figure 22 , montre qu'en absence de stérol l'étruscomycine provoque la lyse totale des érythrocytes. De plus la protection est pratiquement nulle lorsque le rapport étruscomycine:stérol dépasse 1. La protection apportée par le cholestérol est maximale à un rapport près de 0,15, à ce point seulement 10 % des cellules subissent la lyse. A ce même rapport étruscomycine:ergostérol 81 % des cellules subissent la lyse. La meilleure protection obtenue avec l'ergostérol se situe au rapport étruscomycine:ergostérol 0,07, alors que près de 77 % des cellules subissent la lyse.

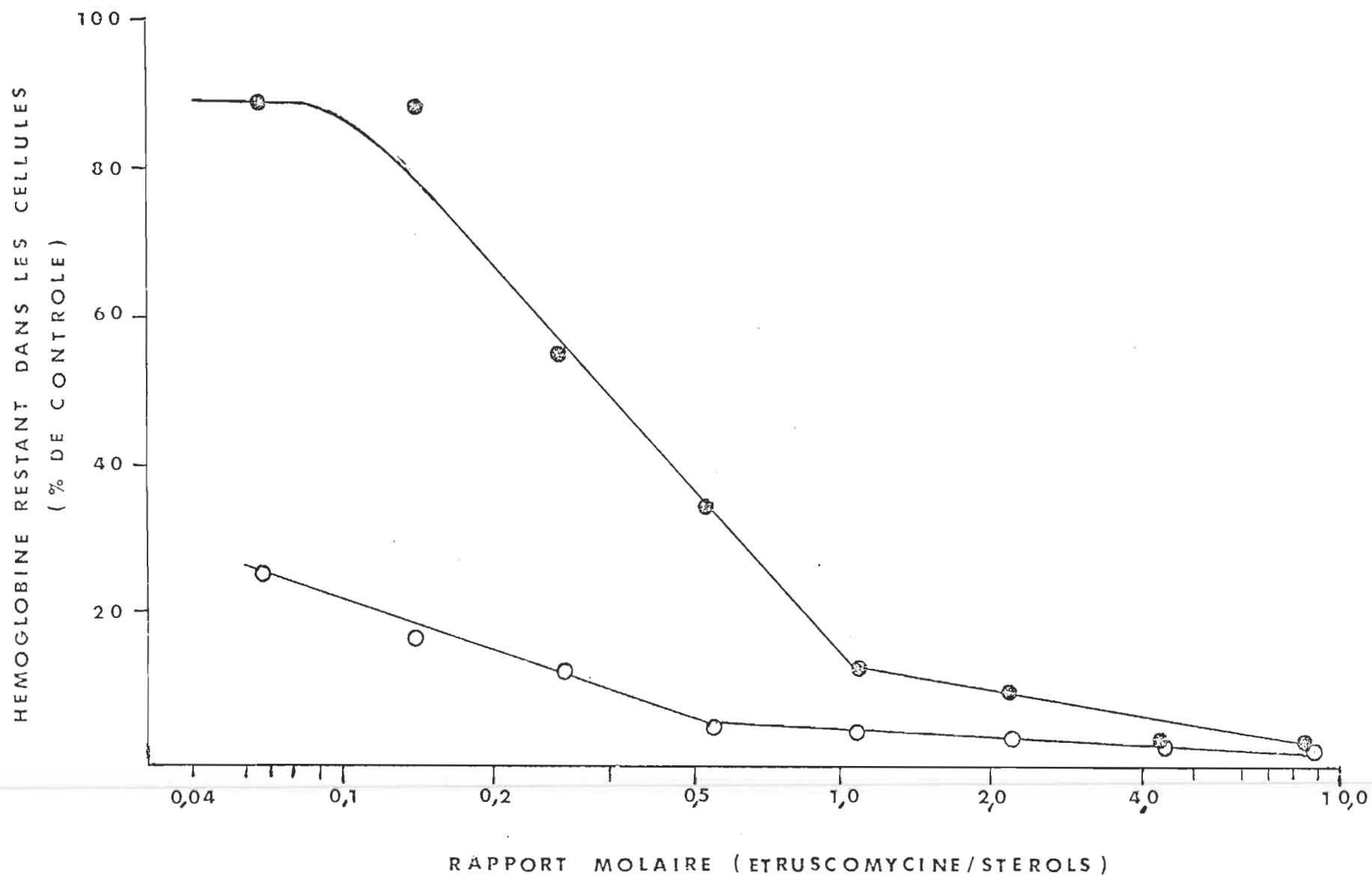


Figure 22. Protection biologique des érythrocytes humains par le cholestérol (●) et par l'ergostérol (○), contre l'action de l'etruscomycine dont la concentration est $7,0 \times 10^{-6}$ M.

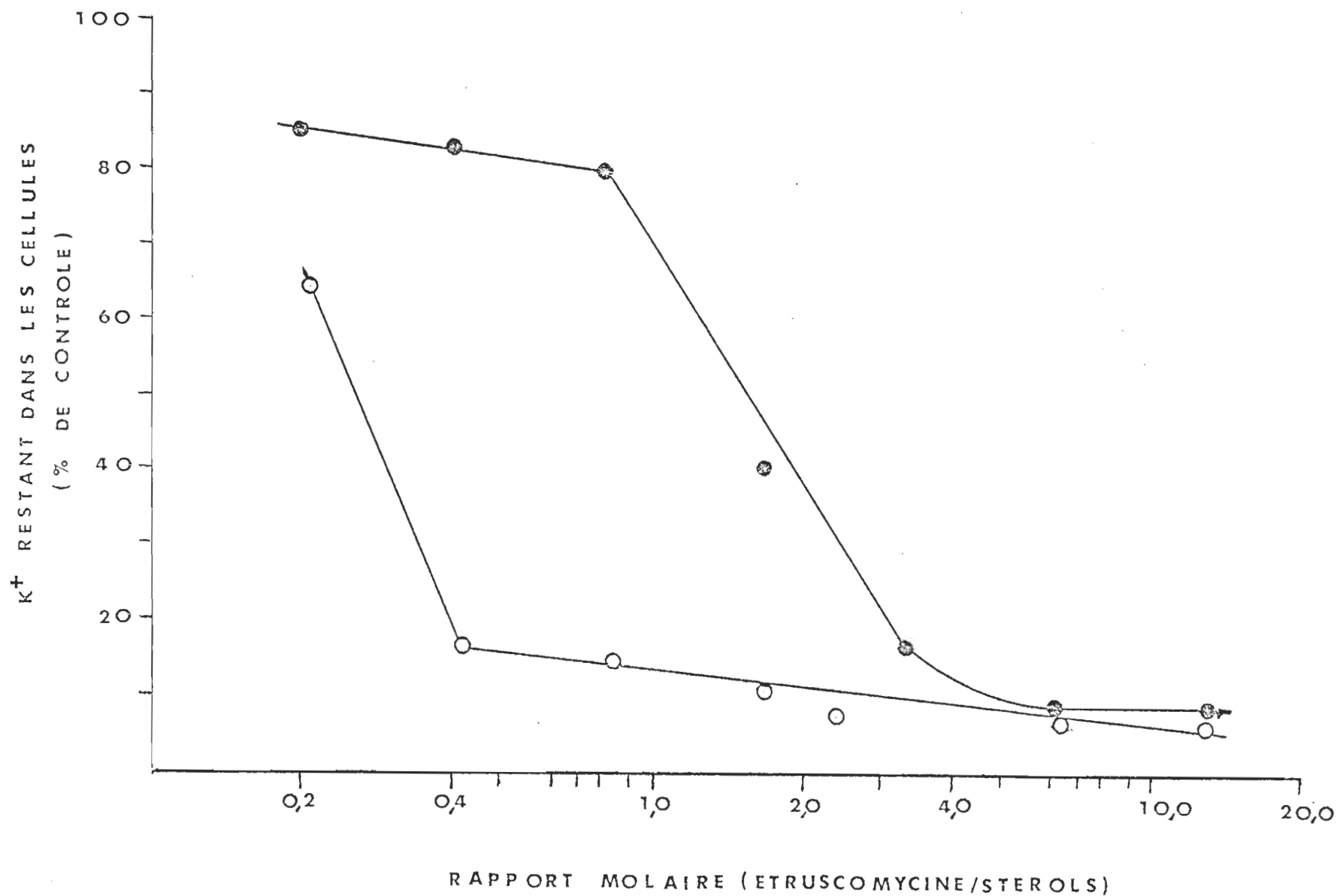


Figure 23. Protection biologique des fungus *Candida albicans* par le cholestérol (●) et par l'ergostérol (○), contre l'action de l'étrusco-mycine dont la concentration est $2,1 \times 10^{-5}$ M.

La figure 23 , montre la protection apportée aux cellules *Candida albicans*, par le cholestérol et l'ergostérol, contre l'action de l'étruscomycine. A très faible concentration de stérol 90 % du contenu de K^+ intracellulaire s'est échappé des cellules. Au rapport étruscomycine:cholestérol 0,8 la protection est élevée puisque 80 % du K^+ est retenu dans les cellules, alors que seulement 18 % du K^+ est retenu dans les cellules, au même rapport étruscomycine:ergostérol

Les cellules *Candida albicans*, qui ont de l'ergostérol dans leur membrane cellulaire, obtiennent une meilleure protection, que les érythrocytes, qui ont du cholestérol à l'intérieur de leur membrane cellulaire. A un rapport molaire étruscomycine:cholestérol de 0,8 une protection élevée de 80 % est mesurée pour les cellules *Candida albicans*, alors qu'elle est seulement de 21 % pour les érythrocytes.

Ces résultats indiquent que l'étruscomycine se lie préférentiellement au cholestérol plutôt qu'à l'ergostérol. De plus, le cholestérol procure la meilleure protection aux deux types de cellules, ce qui confirme à nouveau l'affinité de l'étruscomycine pour le cholestérol.

b) Résultats spectroscopiques

La figure 24, montre une série de spectres différentiels de l'étruscomycine obtenus alors que les mêmes concentrations d'antibiotique et de stérols se retrouvent dans différents milieux de méthanol, soit 1×10^{-5} M. La concentration de méthanol varie entre 10 % et 60 % en volume.

Pour les solutions où le pourcentage d'alcool est égal ou supérieur à 50 % peu d'interaction est observée entre l'étruscomycine et chacun des stérols. Lorsque les solutions contiennent entre 30 % et 40 % en volume de méthanol, et que l'étruscomycine se trouve en présence de cholestérol, l'amplitude du spectre différentiel est de beaucoup supérieure à celle du spectre différentiel obtenu lorsque l'étruscomycine est en présence de l'ergostérol. A 20 % en volume de méthanol et à 319 nm, l'intensité du spectre différentiel obtenu avec l'ergostérol, atteint une valeur d'absorbance différentielle de -0,206, alors qu'à 30 % en volume de méthanol, cette valeur était de -0,053. L'intensité du spectre différentiel obtenu avec le cholestérol à 20 % et 30 % de méthanol, contrairement à celui obtenu avec l'ergostérol, ne subit qu'une faible variation, puisque les valeurs d'absorbance différentielle sont

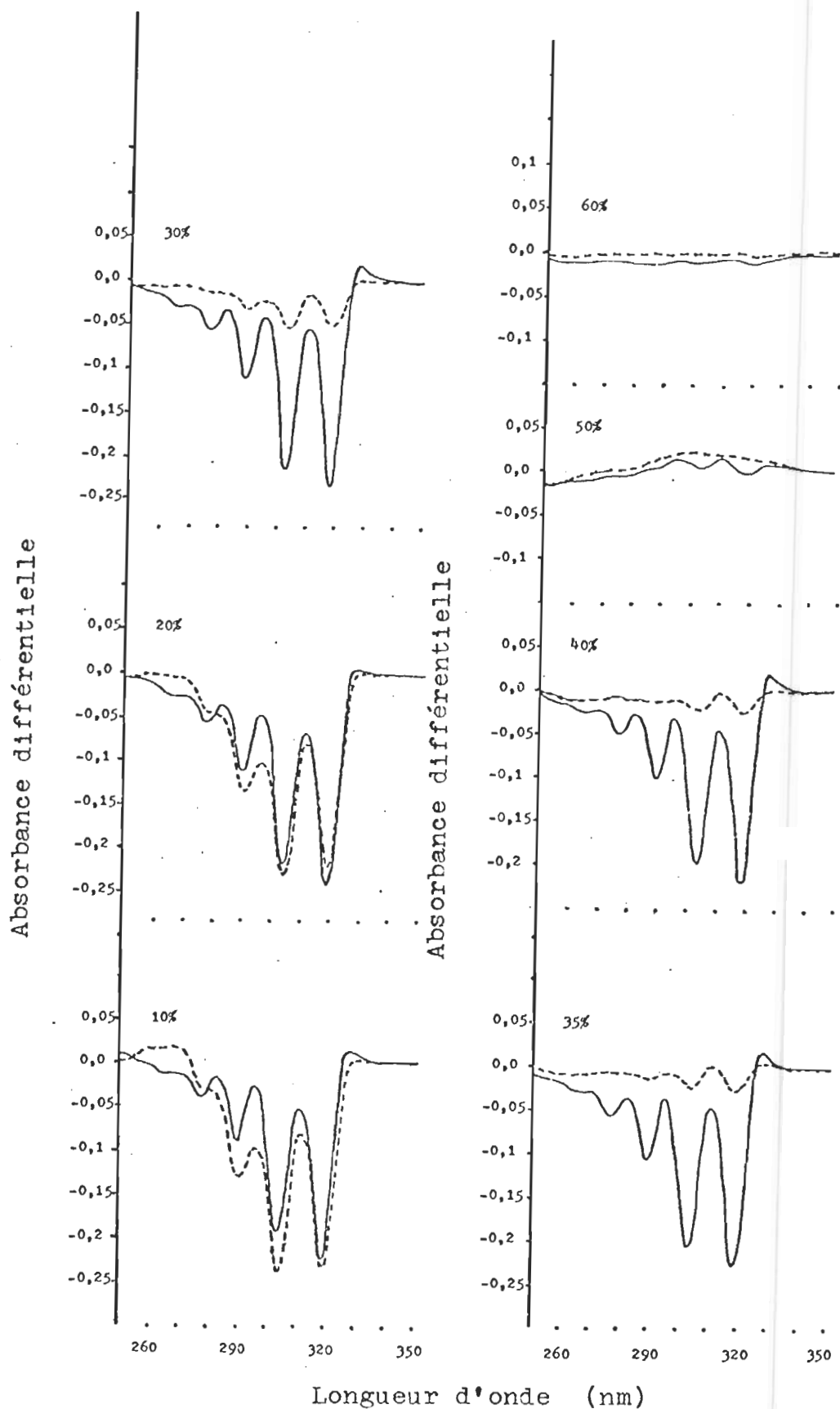


Fig. 24. Spectres d'absorption différentielle de l'étruscomycine en présence des stérols: — cholestérol; --- ergostérol; dans le méthanol.

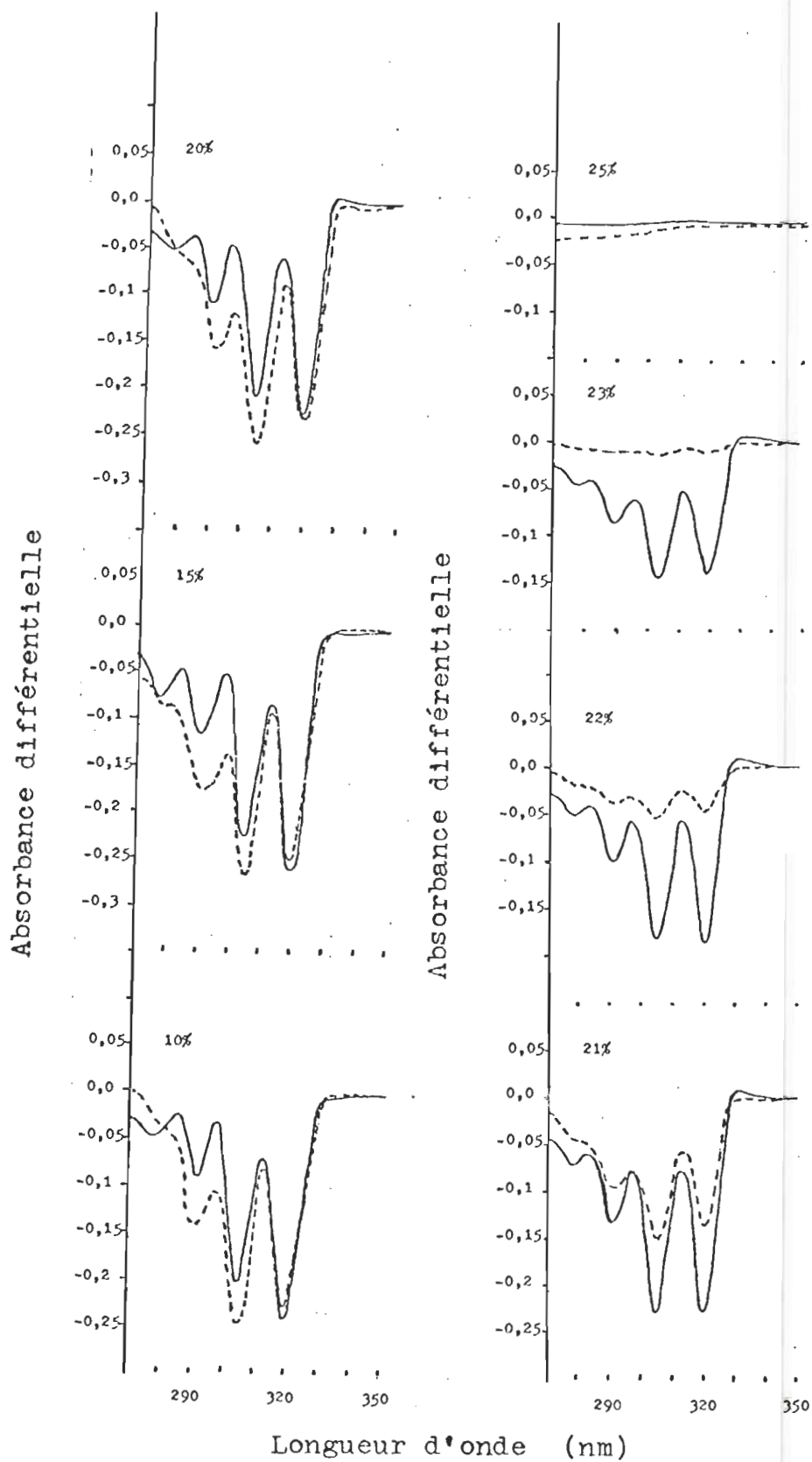


Fig. 25 . Spectres d'absorption différentielle de l'étruscomycine en présence des stérols: — cholestérol; ---- ergostérol; dans le propanol.

respectivement -0,242 et -0,233. A 10 % en volume de méthanol et à 319 nm, l'intensité d'absorbance du spectre obtenu avec l'ergostérol dépasse maintenant celle obtenue avec le cholestérol.

La figure 25 , montre une série de spectres différentiels de l'étruscomycine obtenus, alors que les mêmes concentrations d'antibiotique et de stérols se retrouvent dans différents milieux de propanol, soit 1×10^{-5} M. La concentration de propanol varie entre 10 % et 25 % en volume.

Lorsque la concentration de propanol est égale ou supérieure à 25 %, aucune interaction étruscomycine-stérols n'est observée. Une diminution graduelle de la concentration de propanol dans la solution permet d'observer qu'à 23 % de propanol, l'étruscomycine se lie principalement avec le cholestérol. qu'à 22 % et 21 % de propanol, l'étruscomycine se lie de plus en plus avec chacun des deux stérols, quoique plus avec le cholestérol qu'avec l'ergostérol, et qu'entre 20 % et 10 % de propanol l'étruscomycine se lie à peu près de la même façon avec chacun des stérols.

La figure 26 , présente quatre courbes représentant la

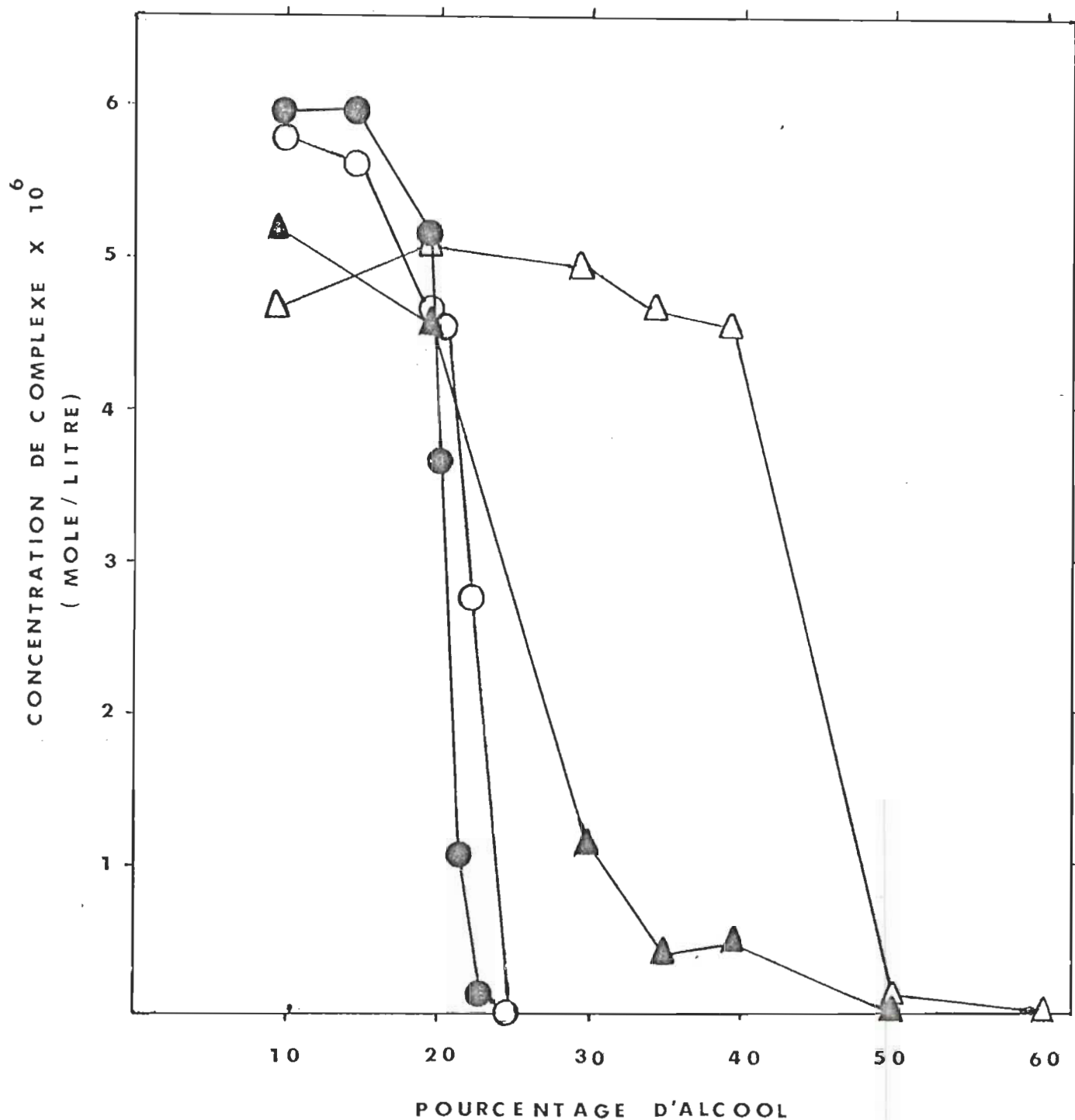


Figure 26. Concentrations des complexes étruscomycine-stérols en fonction des différentes concentrations d'alcools étudiées;
 (Δ) complexe étruscomycine-cholestérol dans le méthanol
 (\blacktriangle) complexe étruscomycine-ergostérol dans le méthanol
 (\circ) complexe étruscomycine-cholestérol dans le propanol
 (\bullet) complexe étruscomycine-ergostérol dans le propanol

Solvant	%V	A _{erg}	A _{chol}	(Cx) _{erg} (Mole.l ⁻¹) (x 10 ⁶)	(Cx) _{chol} (Mole.l ⁻¹) (x 10 ⁶)	S (Mole.l ⁻¹) (x 10 ⁶)
Méthanol	10	-0,232	-0,224	5,27	4,77	0,50
	20	-0,206	-0,242	4,70	5,15	-0,45
	30	-0,053	-0,233	1,20	5,00	-3,80
	35	-0,020	-0,223	0,44	4,73	-4,29
	40	-0,023	-0,216	0,52	4,59	-4,07
	50	0,00	-0,005	0,00	0,11	-0,11
	60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Propanol	10	-0,263	-0,273	5,97	5,80	0,17
	15	-0,264	-0,267	5,99	5,68	0,31
	20	-0,226	-0,220	5,13	4,68	0,45
	21	-0,163	-0,215	3,70	4,57	-0,87
	22	-0,049	-0,178	1,12	3,79	-2,67
	23	-0,010	-0,131	0,23	2,79	-2,68
	25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tableau 2: Effet du cholestérol et de l'ergostérol sur le spectre d'absorption de l'étruscomycine

%V: Concentration en volume d'alcool;

A_{erg}: Intensité du pic à 319 nm pour les solutions d'étruscomycine + ergostérol;

A_{chol}: Intensité du pic à 319 nm pour les solutions d'étruscomycine + cholestérol;

(Cx)_{erg}: Concentration du complexe étruscomycine-ergostérol;

(Cx)_{chol}: Concentration du complexe étruscomycine-cholestérol;

S = (Cx)_{erg} - (Cx)_{chol};

concentration des différents complexes étruscomycine-stérols en fonction du pourcentage d'alcool en méthanol et en propanol. Le tableau 2 , présente les concentrations des complexes étruscomycine-cholestérol et étruscomycine-ergostérol, et les valeurs calculées de sélectivité de l'étruscomycine envers les deux stérols, en fonction de la concentration des deux alcools en solution. Les concentrations des complexes ont été calculées à 319 nm, à partir des spectres différentiels et des coefficients d'extinction molaire, qui sont $6,5 \times 10^4 \text{ l.mole}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ pour l'étruscomycine, $2,1 \times 10^4 \text{ l.mole}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ pour le complexe étruscomycine-ergostérol et $1,8 \times 10^4 \text{ l.mole}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ pour le complexe étruscomycine-cholestérol. La figure 27 , illustre les courbes à partir desquelles ont été déterminés les coefficients d'extinction molaire pour les complexes de l'étruscomycine lié avec les deux stérols. Le coefficient d'extinction molaire de l'étruscomycine ayant été obtenu à partir de la courbe présentée à la figure 7.

Les valeurs de sélectivité pour certaines compositions de solvants sont positives, indiquant que l'étruscomycine se lie préférentiellement à l'ergostérol. Ceci s'observe à 10 % de méthanol et entre 10 % et 20 % de propanol. Ces valeurs de

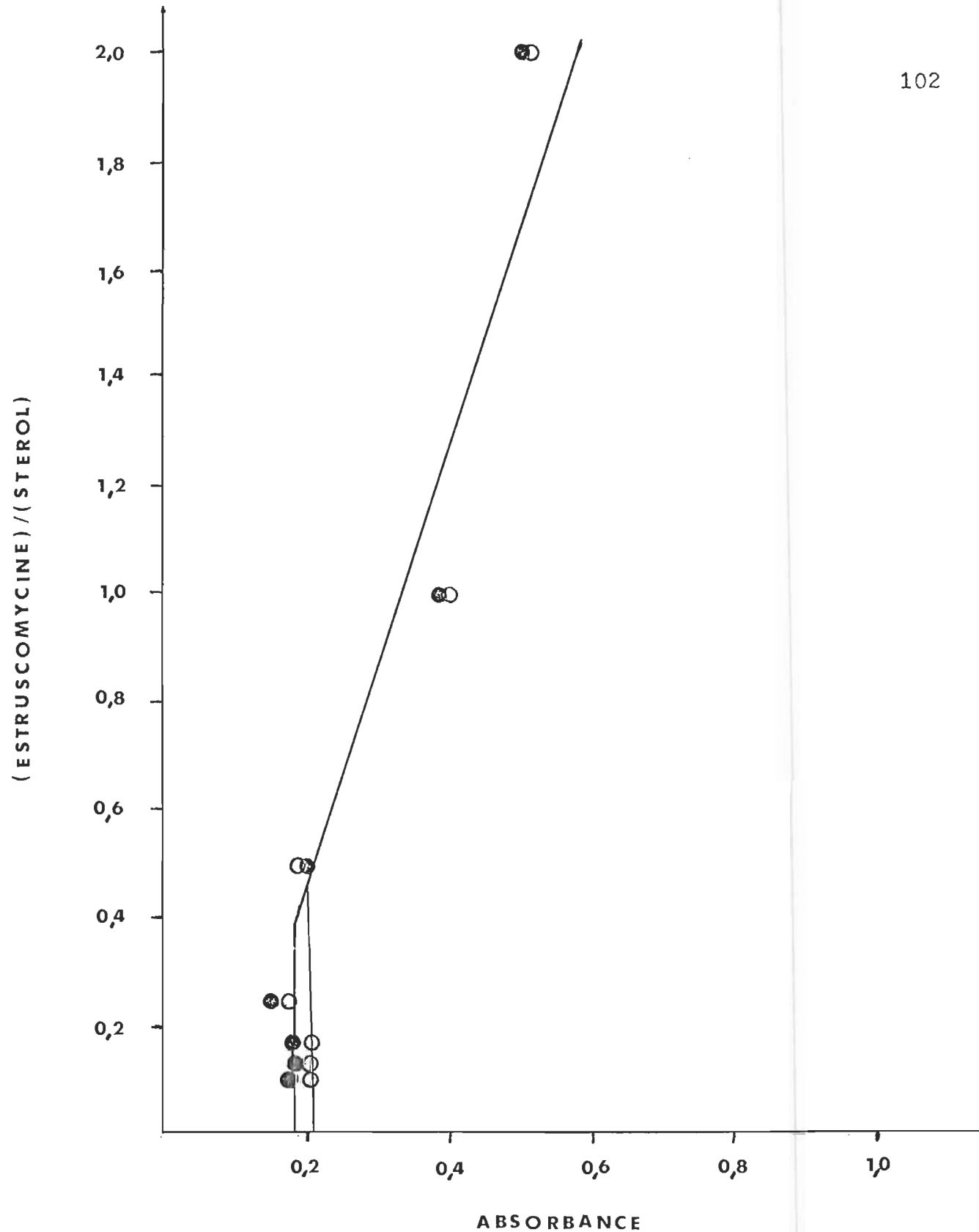


Figure 27. Détermination dans 15 % en volume de propanol, du coefficient d'extinction molaire du complexe étruscomycine-cholestérol (●) et du complexe étruscomycine-ergostérol (○) à 319 nm.

sélectivité sont petites et indiquent, comme le montrent les spectres différentiels, une faible différence entre les concentrations des deux complexes étruscomycine-stérois dans ces milieux. Cependant, entre 20 % et 40 % de méthanol et entre 21 % et 23 % de propanol, les valeurs de sélectivité sont élevées et négatives, indiquant que la différence entre les concentrations des deux complexes étruscomycine-stérois est marquée, et que l'étruscomycine se lie préférentiellement au cholestérol. Ces conditions de solvant sont difficiles et défavorisent la formation du complexe étruscomycine-stérol, ayant la plus petite énergie de cohésion.

La nature hydrophobe des deux complexes étruscomycine-stérois, est mise en évidence par la différence de dissolution de ces derniers dans les deux alcools utilisés. Le propanol, qui est de nature plus hydrophobe que le méthanol, dissout mieux les complexes étruscomycine-stérois, que ne le fait le méthanol. Les figures 21 et 22 ainsi que le tableau 2, montrent qu'à un pourcentage de propanol de 25 % aucun des complexes ne se forment en solution, alors que pour un pourcentage de méthanol de 30 % la concentration du complexe étruscomycine-cholestérol est de $5,00 \times 10^{-6}$ M et que la concentration du complexe étruscomycine-ergostérol est de $1,20 \times 10^{-6}$ M.

Dans l'ensemble, les résultats spectroscopiques et les résultats biologiques montrent une préférence marquée de l'étruscomycine pour le cholestérol. Les résultats spectroscopiques indiquent que dans certaines compositions de solvants (voir le tableau 2), la sélectivité de l'étruscomycine prend une valeur positive, ceci indiquant une affinité supérieure pour l'ergostérol que pour le cholestérol. Le même phénomène, bien qu'il n'ait pas été mesuré quantitativement, a aussi été observé avec la filipine, à 10 % de propanol. Cette observation pourrait expliquer la divergence des résultats présenté ici, et ceux d'autres chercheurs (43, 44), qui mentionnent que l'étruscomycine a plus d'affinité pour l'ergostérol que pour le cholestérol.

L'association antibiotique polyénique-stérol peut exister sous différentes formes de complexations, qui ne sont pas spécifiquement identifiées par spectroscopie différentielle en ultra-violet. La spectroscopie différentielle ne mesure en fait, que la formation des différentes formes de complexes qui impliquent l'espèce libre de l'antibiotique polyénique, car le raisonnement permettant de déterminer la quantité de complexe qui se forme dans un milieu donné, s'appuie sur la disparition de l'espèce libre de l'antibiotique polyénique à l'intérieur de

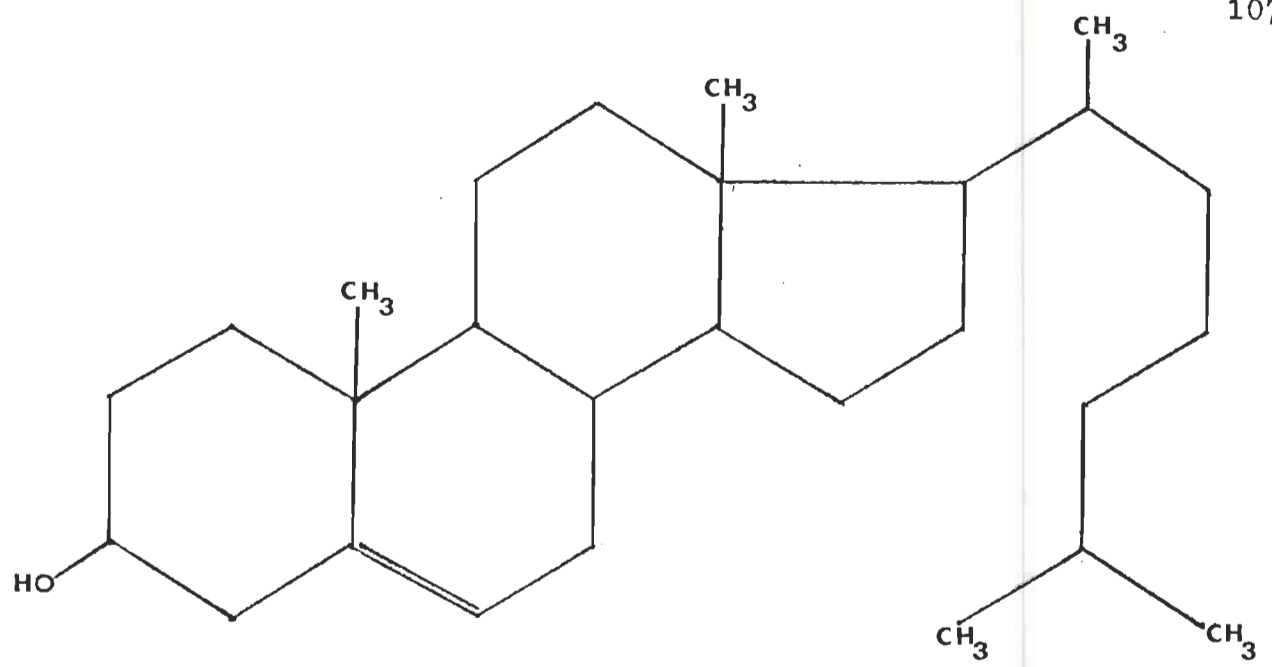
ce milieu. L'étruscomycine se trouve probablement sous forme agrégée, à faible concentration d'alcool. La possibilité que certaines formes de complexations soient plus favorisées dans certaines compositions de solvants, pourrait bien expliquer l'inversion du signe de la sélectivité, qui a été observée avec l'étruscomycine. Le cholestérol, possédant une affinité nettement supérieure à celle de l'ergostérol pour l'étruscomycine, pourrait se lier avec certaines espèces agrégées de l'étruscomycine, ce qui amènerait une diminution de la concentration du cholestérol dans le milieu et abaisserait par conséquent, la quantité de complexe pouvant se former par l'association de l'espèce libre de l'antibiotique et du cholestérol. Il semble donc, qu'il faille prendre en considération, lors de l'étude de l'interaction des antibiotiques polyéniques avec les stérols, la nature du milieu dans lequel s'effectue l'étude.

Ce travail démontre que la présence de l'aminosucres mycosamine, ne confère pas aux antibiotiques polyéniques, une affinité plus grande pour l'ergostérol. Cette caractéristique structurale n'expliquerait donc pas l'affinité préférentielle de l'amphotéricine B pour l'ergostérol. Il semble que la longueur de la partie hydrophobe soit un facteur plus déterminant, que la présence du mycosamine, sur

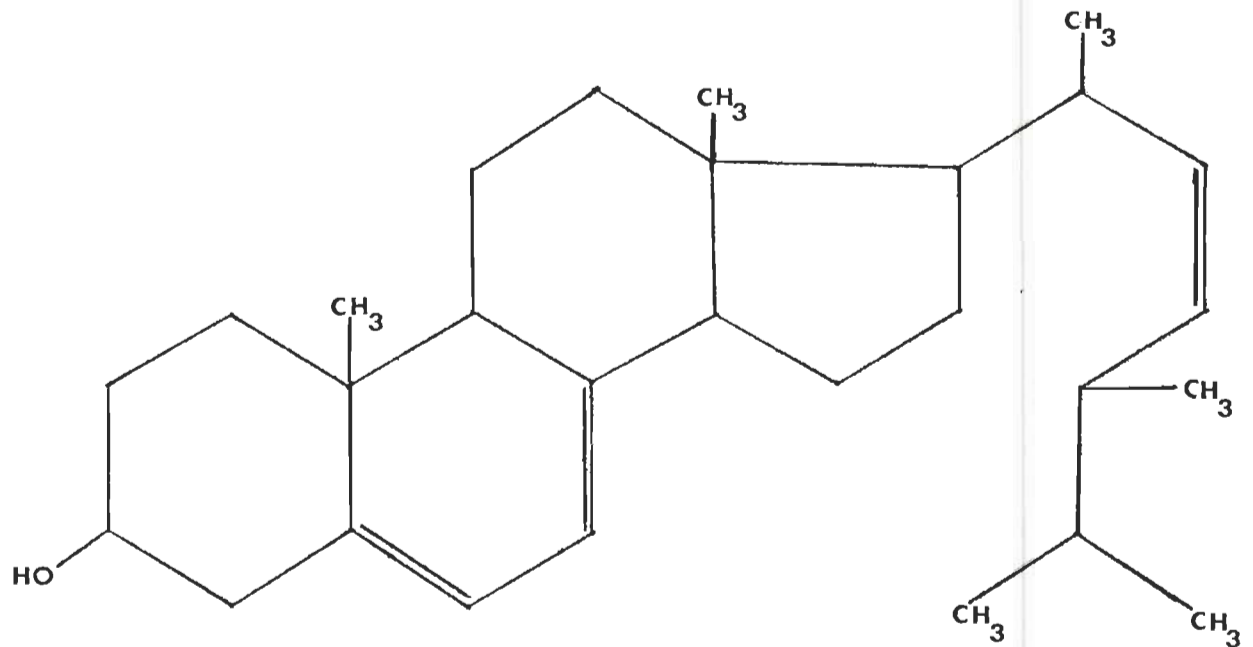
la sélectivité d'un antibiotique polyénique, puisque l'étruscomycine montre un comportement semblable à celui de la filipine.

L'analyse des divers résultats obtenus dans le présent travail, montre que les antibiotiques polyéniques possédant un petit chromophore, tels l'étruscomycine et la filipine, forment avec le cholestérol un complexe dont le caractère hydrophobe est supérieur à celui formé avec l'ergostérol, alors que les antibiotiques possédant un chromophore heptaénique, tels l'amphotéricine B et la nystatine, ce dernier étant considéré comme un heptaène modifié, forment avec l'ergostérol un complexe dont le caractère hydrophobe est supérieur à celui formé avec le cholestérol. Le cholestérol et l'ergostérol sont deux molécules qui se ressemblent, cependant la mobilité de leurs chaînes fixées sur le carbone C₁₇ du squelette des stéroïdes est différente, ceci découlant de la présence d'un lien double sur la chaîne de l'ergostérol. La mobilité de la chaîne de l'ergostérol se trouve ainsi diminuée, relativement à celle du cholestérol, (voir la figure 28).

Si l'on considère, que les deux stérols ont une longueur quasi-identique, lorsque leurs chaînes sont étirées, que cette longueur se compare à la longueur du chromophore heptaénique



CHOLESTEROL



ERGOSTEROL

Figure 28. Structures chimiques du cholestérol et de l'ergostérol.

de l'amphotéricine B (35), et que la chaîne du cholestérol a la possibilité de se replier beaucoup plus facilement que celle de l'ergostérol, il devient plus évident que les chromophores heptaéniques, qui sont des chromophores rigides, forment avec l'ergostérol des complexes ayant un caractère hydrophobe plus prononcé que les complexes formés avec le cholestérol. La rigidité de l'ergostérol favorise un temps d'interaction plus long avec les chromophores heptaéniques, que ne le fait le cholestérol avec sa chaîne mobile.

Les chromophores pentaéniques et tétraéniques forment avec le cholestérol des complexes ayant un caractère hydrophobe plus prononcé que les complexes formés avec l'ergostérol. Ces chromophores sont plus courts que les molécules des deux stérols. La plus grande mobilité de la chaîne du cholestérol, cette dernière pouvant se replier et ainsi entrer en interaction avec le chromophore polyénique plus facilement que ne peut le faire l'ergostérol avec sa chaîne rigide, permet un temps d'interaction stérol-chromophore polyénique plus long qu'avec l'ergostérol.

Certains auteurs (45) considèrent que l'élément structural important de la molécule d'ergostérol, qui le rend plus apte

que le cholestérol à se lier à l'amphotéricine B, est la présence d'un lien double entre les carbones 7 et 8. Il est raisonnable de croire que la double insaturation conjuguée, qui existe dans la molécule d'ergostérol, va favoriser une plus grande association avec la série de liaisons doubles conjuguées du chromophore de l'amphotéricine B, que l'unique insaturation située entre les carbones 5 et 6 du cholestérol.

Le raisonnement présenté ici, rejoint les conclusions de Borisova et Kasumov (46), qui expliquent l'affinité préférentielle de l'amphotéricine B pour l'ergostérol, par la rigidité de la chaîne latérale de l'ergostérol qui est supérieure à celle du cholestérol. De plus ce raisonnement est en accord avec une classification qui a déjà été proposée, où se distinguent deux groupes d'antibiotiques polyéniques, soit les heptaènes et les non-heptaènes (47).

VI

CONCLUSION

La technique spectroscopique différentielle constitue un nouvel outil d'investigation dans le domaine de l'étude de l'interaction des antibiotiques polyéniques et elle contribue à élucider le mécanisme d'action des antibiotiques polyéniques. La qualité rattachée à cette technique, est sans nul doute, la possibilité de mesurer quantitativement la formation des complexes, des divers antibiotiques polyéniques liés avec le cholestérol ou avec l'ergostérol, et cela à l'intérieur de différents milieux.

L'utilisation de la spectroscopie différentielle a permis de déterminer que l'étruscomycine possède plus d'affinité pour le cholestérol que pour l'ergostérol, donc la longueur du chromophore polyénique, qui constitue la partie hydrophobe des antibiotiques polyéniques, plutôt que la présence de la mycosamine, détermine

l'affinité préférentielle pour un stérol.

Les résultats spectroscopiques reflètent d'une certaine façon, les conditions de compétition rencontrées "in vivo", c'est-à-dire, que l'action d'un antibiotique polyénique peut être plus ou moins facile, selon les conditions particulières d'un milieu membranaire, puisque l'antibiotique polyénique, pour se lier aux stérols et former un complexe, doit rivaliser avec les constituants membranaires déjà liés avec les molécules de stérols.

De plus, l'étude faite avec les divers types de liposomes de lécithine d'oeuf, a montré qu'à l'instar des stérols, les phospholipides procurent aux érythrocytes humains une protection biologique non négligeable. Il semble donc que l'action des antibiotiques polyéniques sur les membranes cellulaires, ne dépend pas uniquement de la présence de stérol, mais que d'autres constituants, tels les phospholipides, soient impliqués dans le mécanisme d'action des antibiotiques polyéniques.

Récemment, une action anticancéreuse des antibiotiques polyéniques a été découverte (49). Si on admet que l'action des antibiotiques polyéniques sur les cellules est liée à la formation de complexes avec les stérols membranaires, et que

les cellules cancéreuses sont plus sensibles que les cellules normales à la présence d'antibiotique polyènique, bien qu'elles contiennent toutes deux du cholestérol, on est tenté de croire, que l'interaction du cholestérol avec les autres constituants membranaires est différente chez les deux types de cellules. Bien qu'il s'agisse ici d'une hypothèse parmi d'autres, l'étude de l'association du cholestérol et des constituants membranaires à l'intérieur de ces deux types de cellules, serait un sujet d'étude intéressant.

LISTE DES OUVRAGES CITES

- (1) Asselineau, J. et Zalta, J.P., Les antibiotiques structure et exemples de mode d'action, Hermann, 1973, 364 p.
- (2) Waksman, S.A., The actinomycetes a summary of current knowledge, The Ronald Press Company, New-York, 1967, 280 p.
- (3) Brown, R. et Hazen, E.L., (1949), Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 71, 451
- (4) Hammond, S.M., (1977), Progress in Medicinal Chemistry, 14, 105
- (5) Hamilton-Miller, J.M.T., (1973), Bacteriological Reviews, 37 (2), 166
- (6) Waksman, S.A. et Lechevalier, H., The actinomycetes, Williams & Wilkins Co., Vol. III, 1962
- (7) Brittain, E.F.H., George, W.O., Wells, C.H.J., Introduction to molecular spectroscopy theory and experiment, Academic Press, New-York, 1970, 387 p.
- (8) Schelger, R. et Thrum, H., (1971), J. Antibiot., 24, 368
- (9) Dutcher, J.D., Walters, D.R. et Wintersteiner, O., (1963), J. Org. Chem., 28, 995
- (10) Saltza, M.V., Dutcher, J.M., Reid, J. et Wintersteiner, O., (1963), J. Org. Chem., 28, 999
- (11) Stevens, V.L., Gupta, S.K., Glinski, R.P., Taylor, K.G., Blumbergs, P., Schaffner, C.P. et Lee, C.H., (1968), Carbohydr. Res., 7, 502
- (12) Lee, C.H. et Schaffner, C.P., (1966), Tetrahedron Lett., 5837
- (13) Rickards, R.W., Smith, R.M. et Golding, B.T., (1970), J. Antibiot., 23, 603
- (14) Tingstad, J.E. et Garrett, E.R., (1960), J. Am. Pharm. Ass., 49, 352

- (15) Dekker, J. et Ark, P.A., (1959), Antibiot. & Chemother.,
9, 327
- (16) Shadomy, S., Brummer, D.L. et Ingroff, A.V., (1973),
Am. Rev. Resp. Dis., 107, 303
- (17) Block, E.R. et Bennet, J.E., (1973), Antimicrob. Agents
Chemother., 4, 648
- (18) Osteux, R., Tran-van-Ky et Biquet, P., (1958), C.R. Acad. Sci.,
247, 2475
- (19) Gottlied, D., Carter, H.E., Sloneker, J.H. et Amman, A.,
(1958), Science, 128, 361
- (20) Lampen, J.O., Arnow, P.M. et Safferman, R.S., (1960),
J. Bacteriol., 80, 200
- (21) Feingold, D.S., (1965), Biochem. Biophys. Res. Commun.,
19, 261
- (22) Weber, M. et Kinsky, S.C., (1965), J. Bacteriol., 89, 306
- (23) Hammond, S.M. et Kliger, B.N., (1974), Microbios., 10, 97
- (24) Chen, W.C. et Bittman, R., (1977), Biochemistry, 16 (19),
4145
- (25) Hsu Chen, C.C. et Feingold, D.S., (1973), Biochem. Biophys.
Res. Commun., 51, 972
- (26) Marty, A. et Finkelstein, A., (1975), J. Gen. Physiol.,
65, 515
- (27) Iannitelli, R.C. et Ikawa, M., (1980), Antimicrob. Agents
Chemother., 17, 861
- (28) Silbert, D.F., (1975), Annu. Rev. Biochem., 44, 315
- (29) De Kruijff, B., Demel, R.A. et Van Deenen, L.L.M., (1972),
Biochim. Biophys. Acta, 255, 331
- (30) De Kruijff, B., Van Dijck, P.W.M., Goldbach, R.W., Demel, R.A.
et Van Deenen, L.L.M., (1973), Biochim. Biophys. Acta,
330, 269

- (31) De Kruijff, B., Demel, R.A., Slotboom, A.J., Vandeenen, L.L.M. et Rosenthal, A.F., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, 307, 1
- (32) Andreoli, T.E., Dennis, V.W. et Weigl, A.M., (1969), *J. Gen. Physiol.*, 53, 133
- (33) Andreoli, T.E., (1974), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 235, 448
- (34) Holz, R.W., (1974), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 235, 469
- (35) De Kruijff, B. et Demel, R.A., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, 339, 57
- (36) De Kruijff, B., Gerritsen, W.J., Oerlemans, A., Demel, R.A. et Van Deenen, L.L.M., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, 339, 30
- (37) Rottem, S., Bittman, R. et Slutzky, G.M., (1976), *Proc. Soc. Gen. Microbiol.*, III, 165
- (38) Archer, D.B. et Gale, E.F., (1975), *Journ. of Gen. Microbiology*, 90, 187
- (39) Hamilton-Miller, J.M.T., (1974), *Advan. Appl. Microbiol.*, 17, 109
- (40) Green, C., (1977), *International review of Biochemistry, Biochemistry of Lipids II*, 14, 101
- (41) Singh, M., Jayakumar, A. et Prasad, R., (1979), *Microbios.*, 24, 7
- (42) *The Merck Index*, (1963), 8^o ed., Merck et Co. Inc., Rahway, N.Y., p. 253 et 416
- (43) Ghione, M., Sanfilippo, A., Mazzoleni, R. et Migliacci, A., (1961), *Giornale Di Microbiologia*, 9, 73
- (44) Teerlink, T., De Kruijff, B. et Demel, R.A., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, 599, 484
- (45) Feigin, A.M., Belousova, I.I. et Tereshin, I.M., (1978), *Antibiotic*, 23 (12), 1079

- (46) Borisova, M.P. et Kasumov, KH.M., (1978), *Studia Biophysica*,
Heft 3, 197
- (47) Kotler-Brajtburg, J., Medoff, G., Kobayashi, G.S., Boggs, S.,
Schlessinger, D., Pandey, R.C. et Rinehart Jr, K.L.,
(1979), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 15, 716
- (48) Sokoloff, L. et Rothblat, G.H., (1974), *Proc. Soc. Exp.*
Biol. Med., 146 (4), 1166
- (49) Valeriote, F., Medoff, G. et Dieckman, J., (1979),
Cancer Res., 39, 2041